GE Healthcare
Life Sciences

Biacore

Biacore T200

Instrument Handbook

日本語取扱説明書
応用編

GE imagination at work

71-3416-33

目次

1. 結合の有無の確認、スクリーニング 1

1-1. プログラムの実行 1

1-2. データ解析 10

2. 低分子化合物アナライトの相互作用測定 20

2-1. プログラムの実行 23

2-2. データ解析 34

3. 濃度測定 43

3-1. 検量線を利用した濃度測定 43
3-1-1. プログラムの実行 44
3-1-2. データ解析 54

3-2. 検量線不要の濃度測定 63
3-2-1. プログラムの実行 68
3-2-2. データ解析 85

4. 熱力学的パラメータの算出 93

4-1. プログラムの実行 95

4-2. データ解析 103

5. 結合アナライトの回収 111

5-1. プログラムの実行 112

6. 免疫原性試験 125

6-1. スクリーニング 130
6-1-1. プログラムの実行（Merged Inject 法の場合） 130
6-1-2. プログラムの実行（Double Mix 法の場合） 137
6-1-3. データ解析 139

6-2. 阻害法を利用した ADAs の同定 144
6-2-1. プログラムの実行 144
6-2-2. データ解析 150

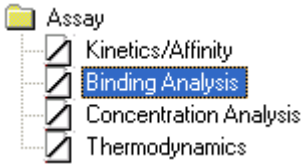
6-3. ADAs のアイソタイプの同定 154
6-3-1. プログラムの実行（Merged Inject 法の場合） 154
6-3-2. プログラムの実行（Double Mix 法の場合） 160
6-3-3. データ解析 162

6-4. ADAs の成熟度の確認 165
6-4-1. プログラムの実行 165
6-4-2. データ解析 171

1. 結合の有無の確認、スクリーニング

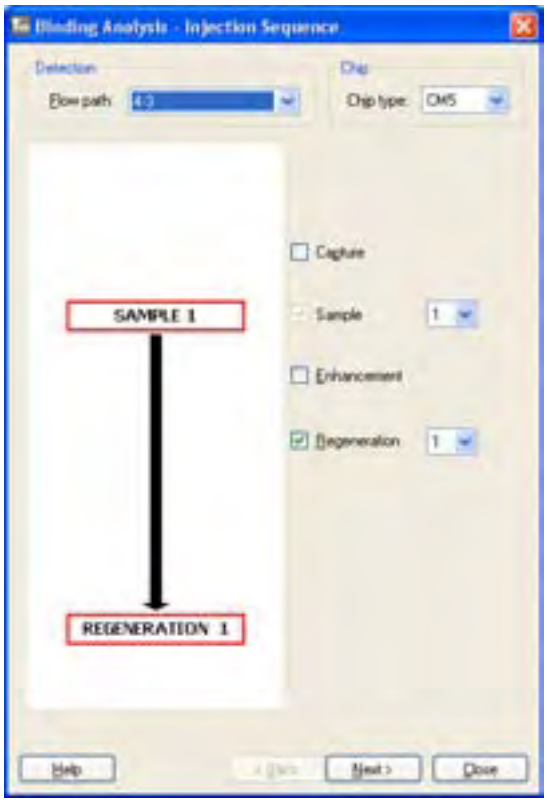
1-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Wizard アイコン（ または Menu bar の Run → Wizard...をクリックします。



Assay → Binding Analysis を選択した後、New...をクリックします。以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、Open...をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、Browse...をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして Open...をクリックします。なお、低分子化合物のスクリーニングを実施する場合には、テンプレートのメソッドを利用します。

↓



1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。

Detection

Flow path　目的のフローセルを設定します。
リファレンスの差し引き機能を利用してください。キャプチャー法を利用する場合、差し引き機能として 2-1 または 4-3 のみの選択となります。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップを選択します。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドを捕捉する場合にチェックを入れます。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされます。

Sample

アナライトの添加。複数サンプルの連続添加は、補足 1-1 を参照してください。

Enhancement

2 次抗体などを添加する場合にチェックを入れます。

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れます。添加回数を選択します。(1 or 2)

入力後、Next >をクリックします。

↓

ダミーランサイクルを設定します。

Startup

Solution　指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施します。通常は、ランニング緩衝液を用います。

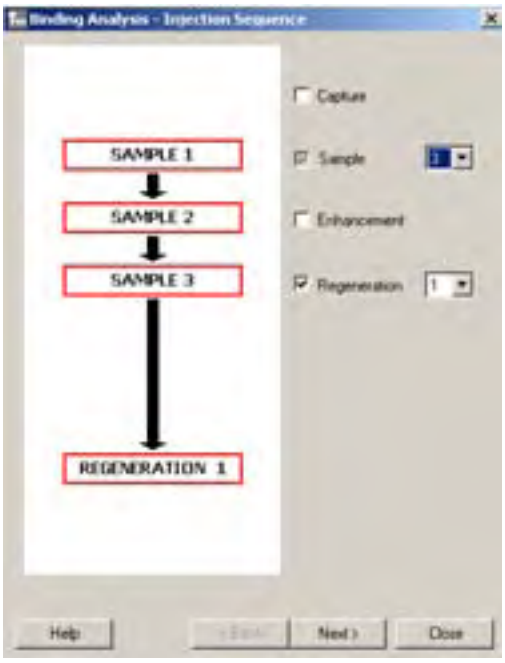
Number of cycles　サイクル数。3 回以上を推奨します。

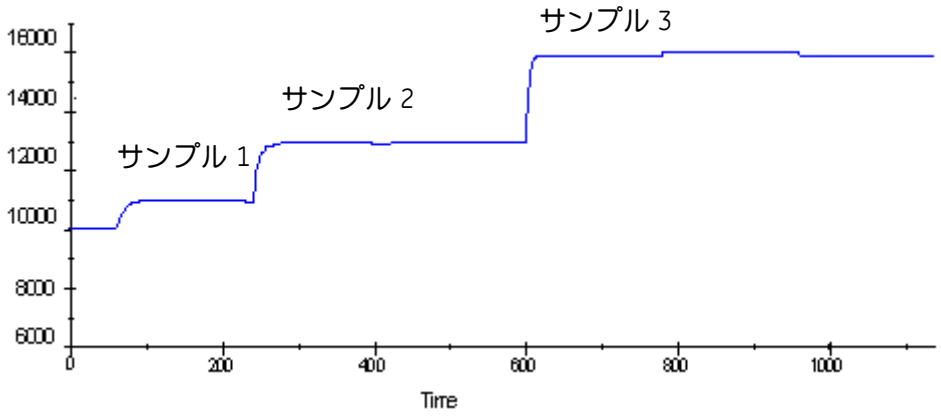
Next >をクリックします。

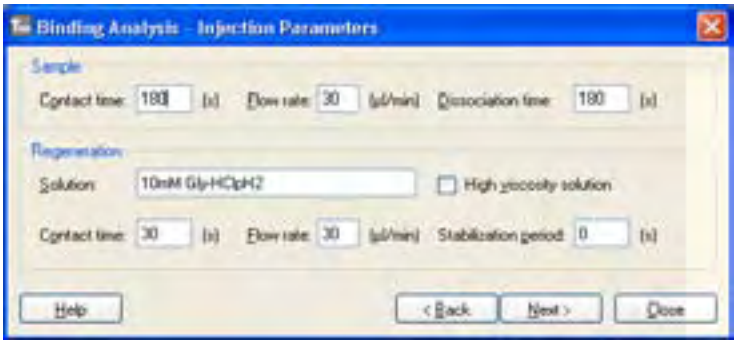
↓

補足 1-1. 複数サンプルの連続添加

エピトープマッピング等多段階の相互作用を検証する場合は、Sample 右のカラムで添加サンプル数を選択します。最大 4 サンプルまでの添加が可能です。







Sample

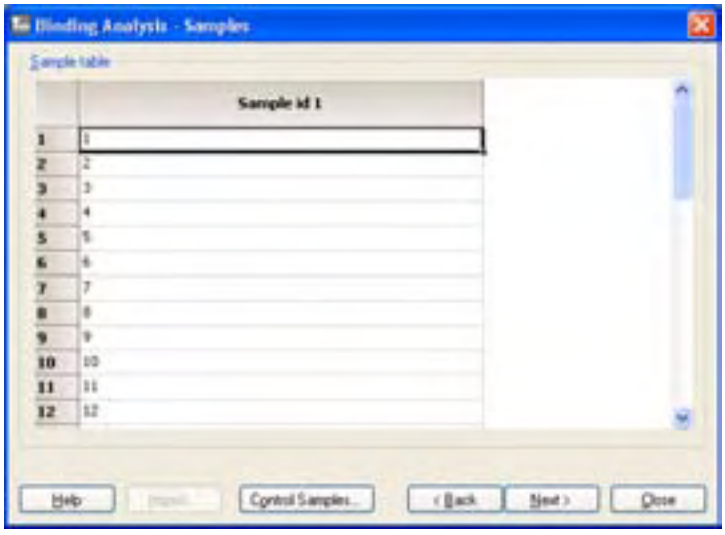
Contact time	アナライトの添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Dissociation time	解離時間（s）

Regeneration

Solution	再生溶液の名称
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40% エチレングリコール以上）の場合は選択します
Contact time	再生溶液の添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Stabilization period	添加後のベースラインの安定化時間（s）

設定後、Next >をクリックします。

↓



Sample id　　アナライトの名称を入力します。入力した順番で測定します。

コントロールサンプルを定期的に添加する場合は、Control Samples...をクリックします。

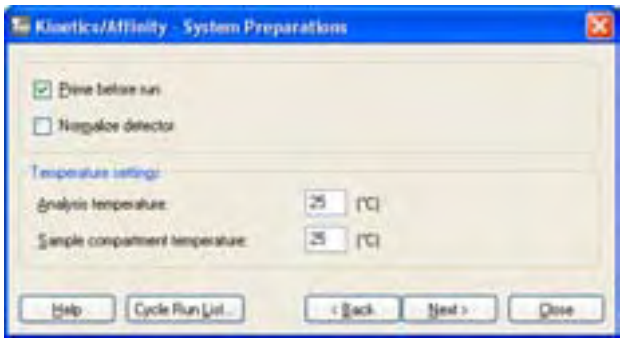
Repeat control sample(s) every　何サンプルごとにコントロールサンプルを測定するか入力します。入力後、OK をクリックします。

Next >をクリックします。

補足 1-2. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は.txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力してください。

↓



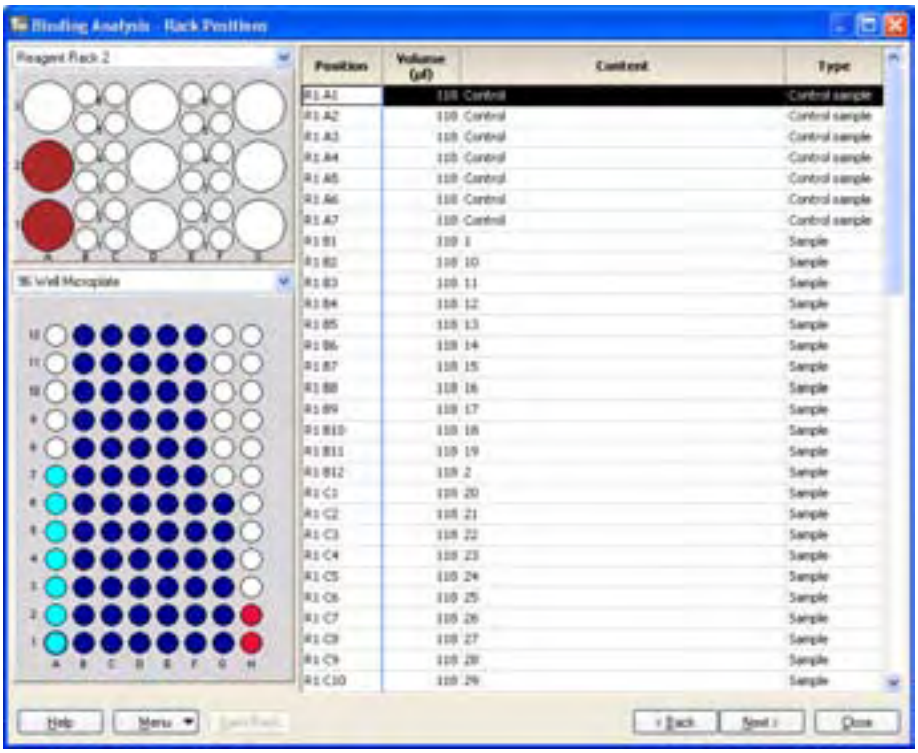
測定を始める前の Prime before run および Normalize detector の実施を選択します。

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

サイクルの測定順番を確認したい場合には、Cycle Run List...をクリックします。

Next >をクリックします。

↓



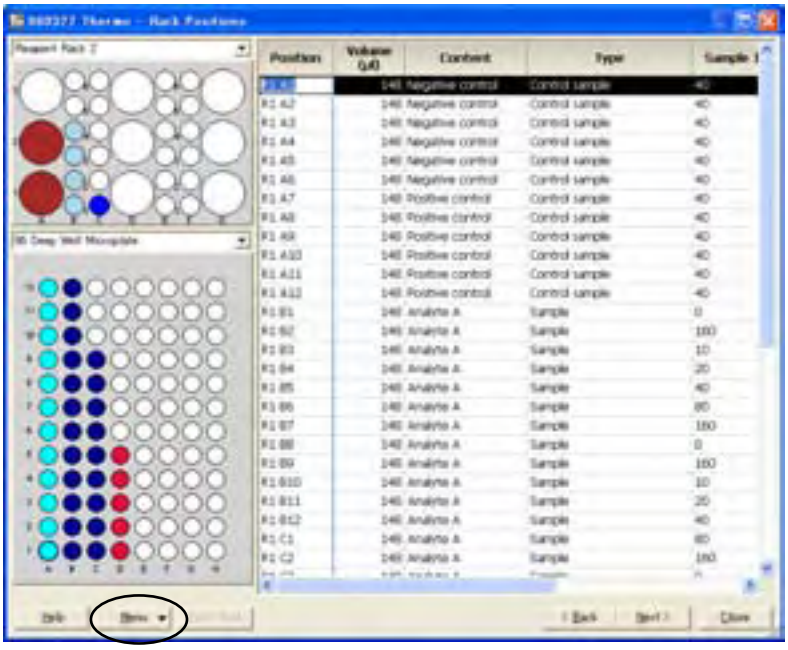
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 1-3. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import... でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

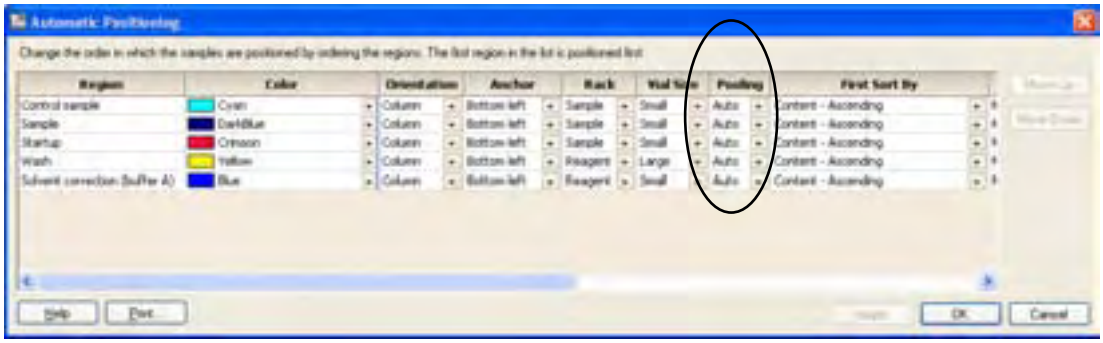
補足 1-4. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれている（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。



Menu から Automatic Positioning... を選択します。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置設定をおこなうことができます。
“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。
同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

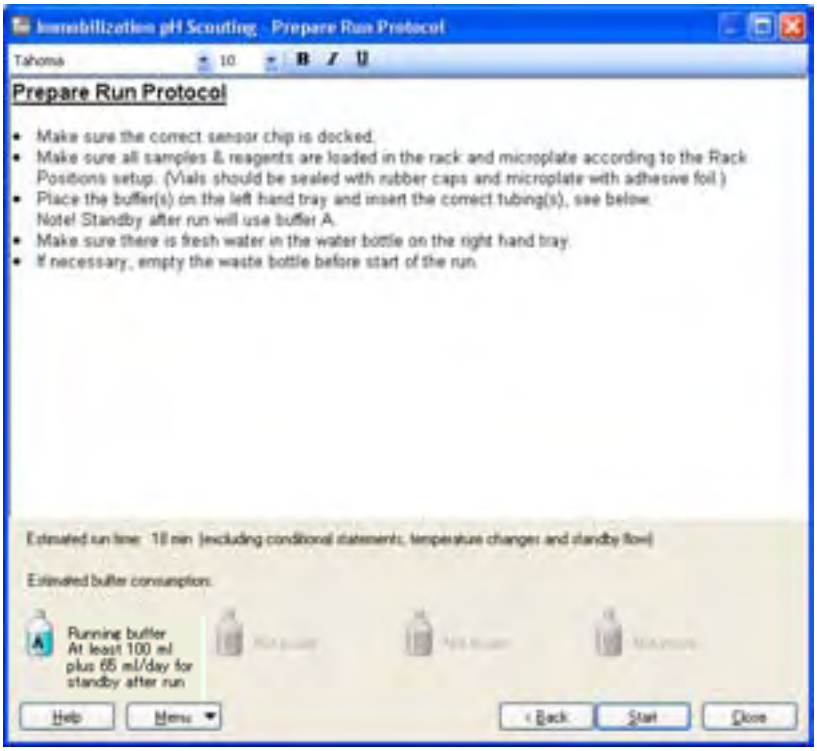
なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、OK をクリックします。
Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の Next をクリックします。

↓

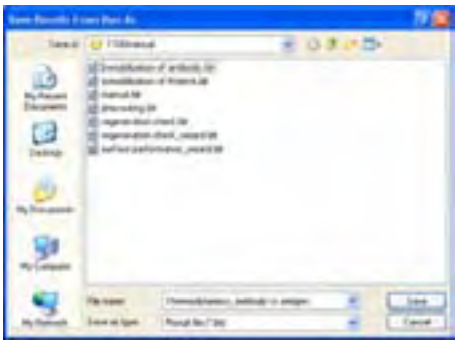


基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。
保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don’t Save を選択します。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定が開始されます。

↓

測定終了後、装置は Standby flow 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

補足 1-5. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックします。

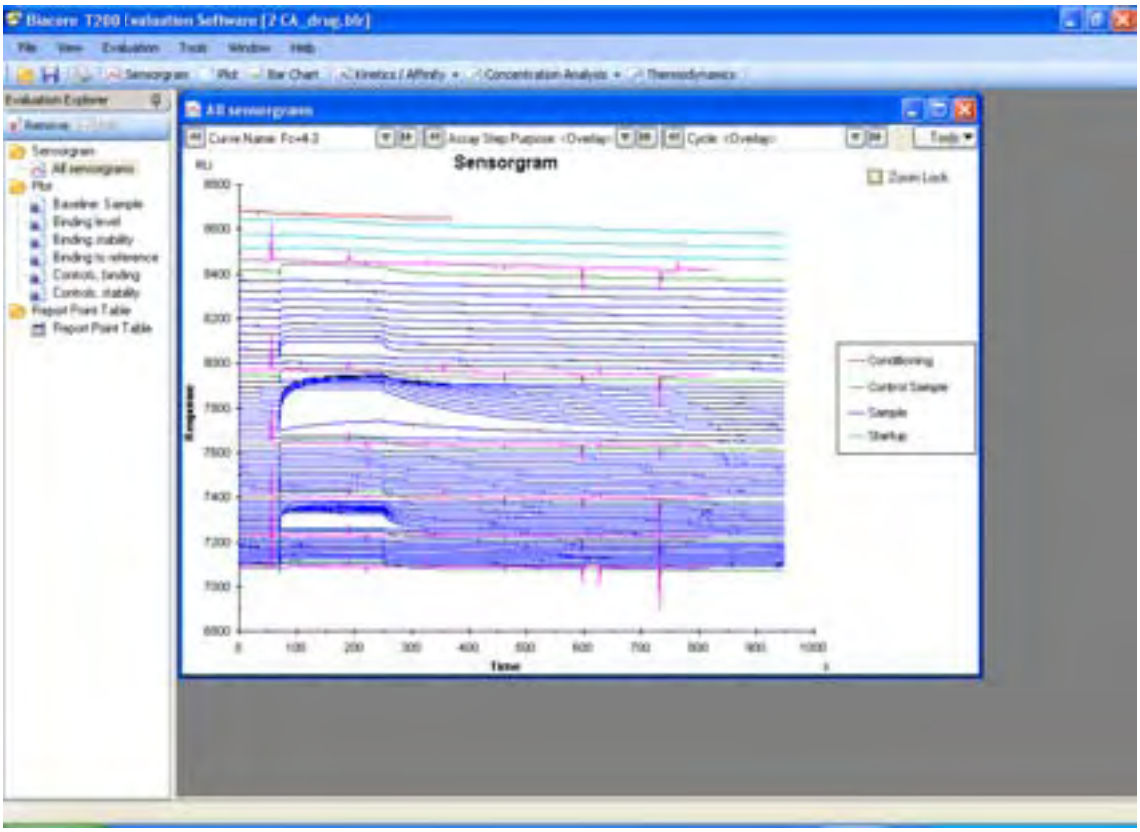
ボックス中の Stop Run をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

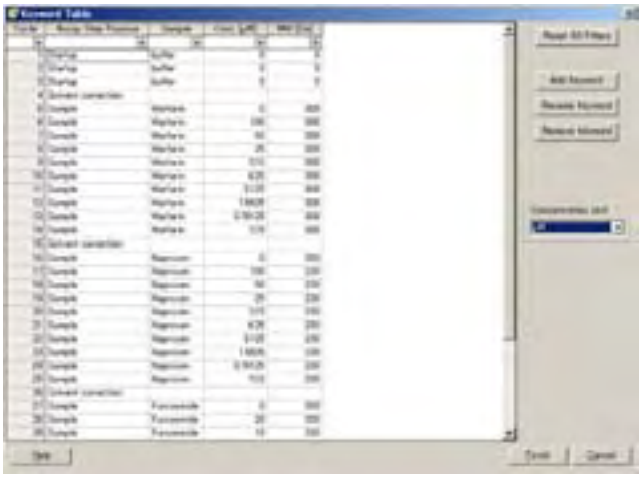
1-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行されます。

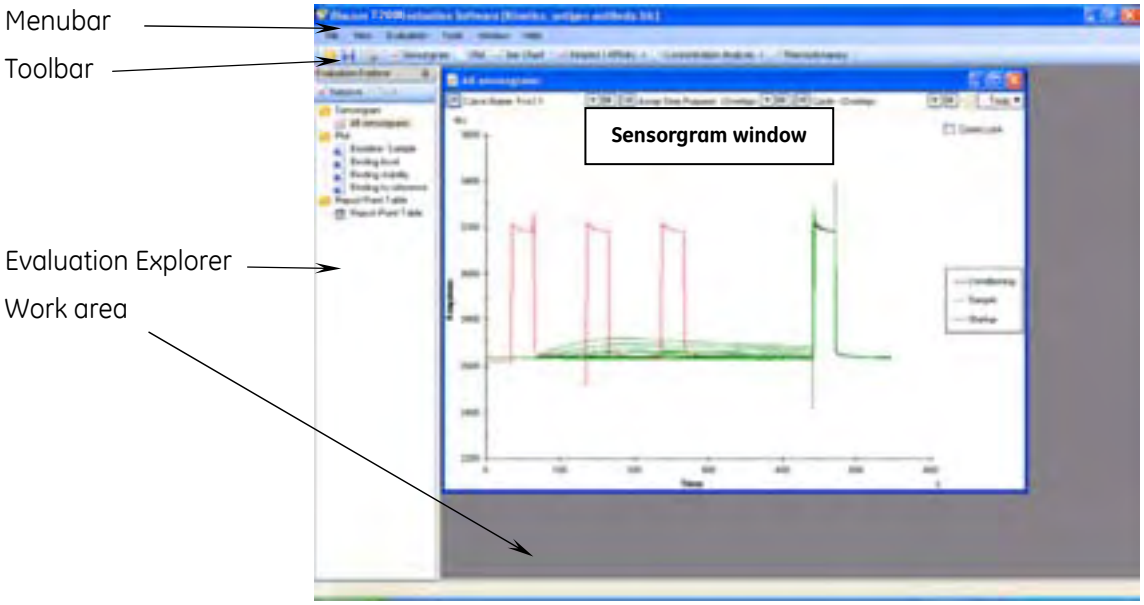


補足 1-6. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table...で変更します。Tools... → Keyword Table...をクリックします。
ただし、リガンド名の変更はできません。



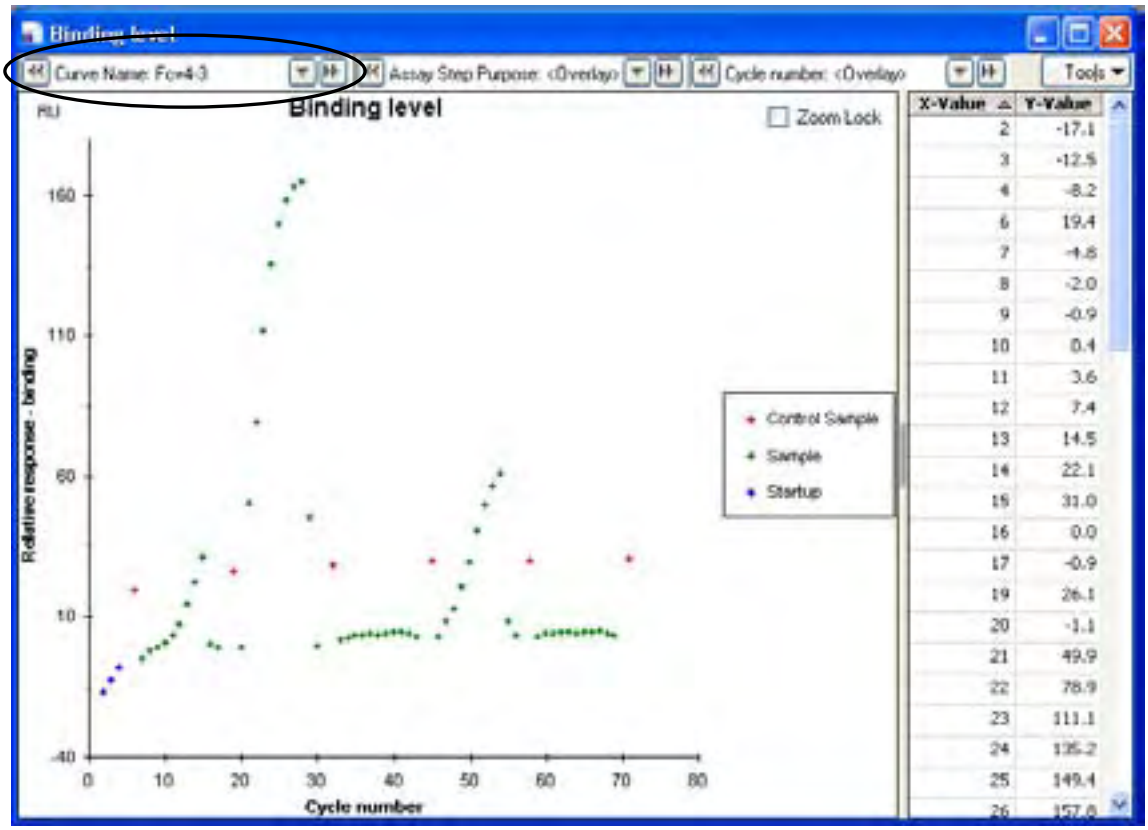
補足 1-7. 画面の説明

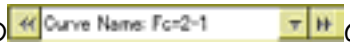


Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Binding level ファイルを利用したランキングとピックアップ

Evaluation Explorer 中の Plot フォルダの Binding level をクリックします。
全測定サイクル分（ダミーランによる緩衝液添加、コントロールサンプル測定を含む）について、サンプル添加終了直前の結合レスポンスのプロットとテーブルが表示されます。



プロット上部の 

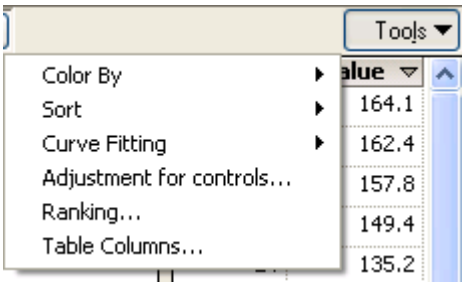
の◀もしくは▶をクリックし、評価したいデータを選択します。プロット内のポイントにマウスを移動すると、サンプル情報が表示されます。

↓

プロットの並び替えをおこなう場合は、右側のテーブルの Y-Value をクリックします。
カラムタイトルが、Y-Value ▲に変更され、結合レスポンスが低い順に並び替えられます。
引き続き、Y-Value ▲をクリックすると、カラムタイトルは Y-Value ▼に変更され、高い順に並びます。

↓

結合量別にピックアップをおこなう場合は、右テーブル上部の Tools をクリックします。



Ranking...をクリックします。

↓

評価基準となる結合レスポンス（RU)、非結合レスポンス（RU）等を設定します。

One Ranking Boundary

境界基準を 1 つ設定します。First value:に評価基準となる数値を入力します。

（例）ネガティブコントロールサンプルの結合レスポンス　　2（RU）

Two Ranking Boundaries

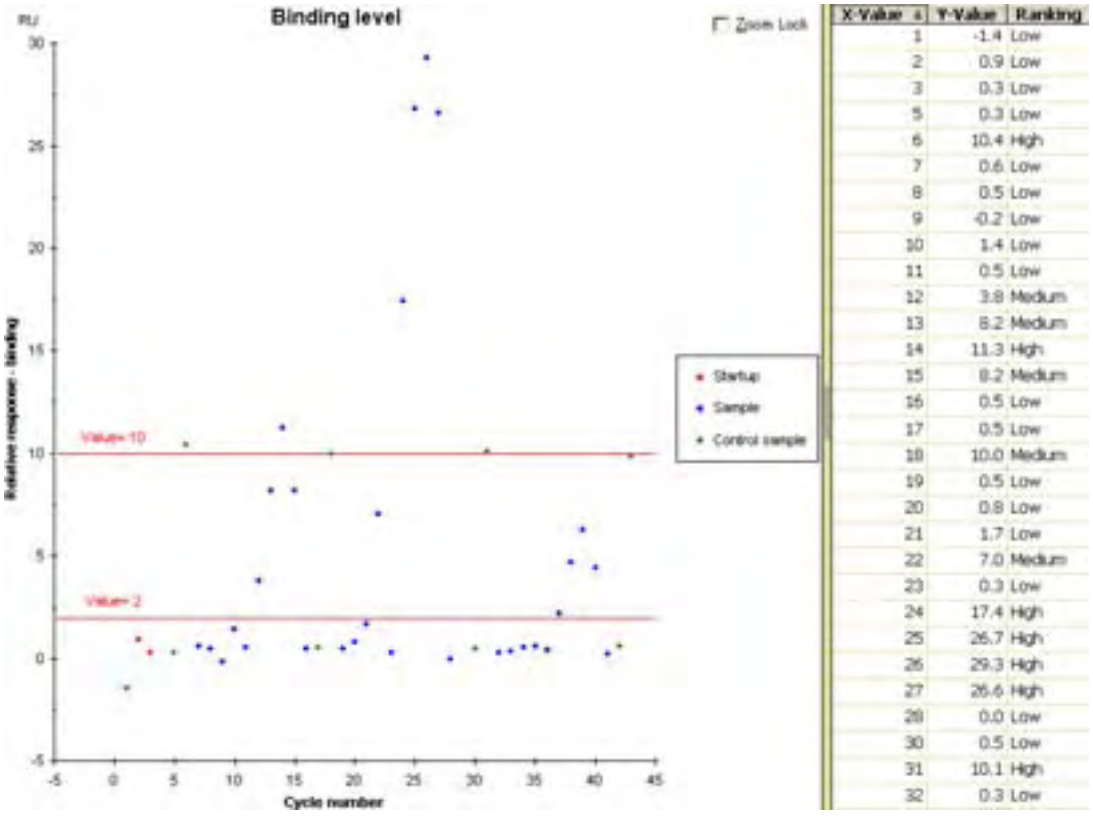
境界基準を 2 つ設定します。First value:および Second value:に評価基準となる数値を入力します。

（例）ポジティブコントロールサンプルの結合レスポンス　　50（RU）

Finish をクリックします。

↓

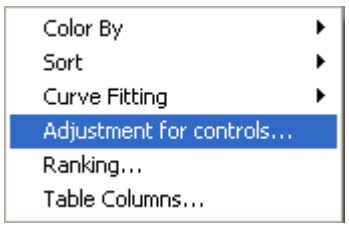
設定した結合レスポンスの値にラインが引かれます。同時に、右表には、First value 値より結合レスポンスが低いサイクルには Low、Second value 値より高いものには High、その中間に属するものには Medium の表示が入ります（次ページ図)。

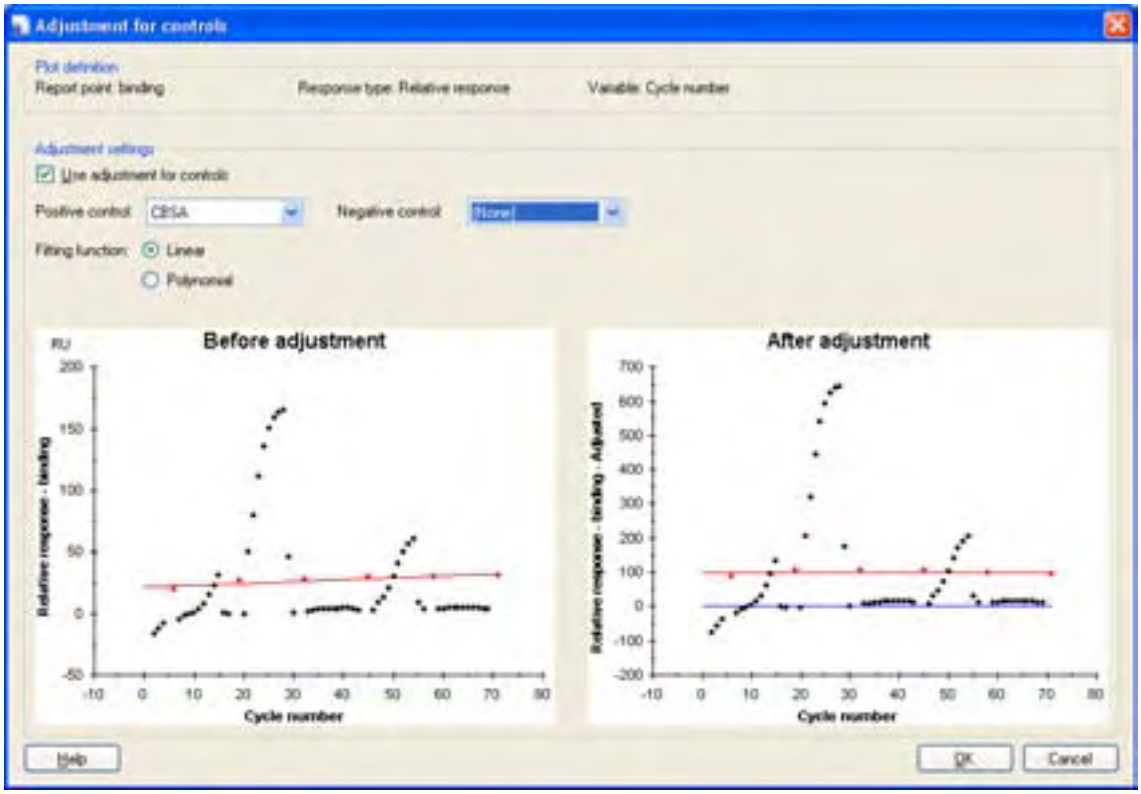


補足 1-8. コントロールサンプルによる結合量補正

経時的にリガンドが失活する場合や、再生条件が不十分な場合には、サイクルごとにリガンドの結合キャパシティーが低下しています。コントロールサンプルを定期的に測定している場合には、コントロールサンプルの結合量低下が確認できます。この場合、結合量のランキングを正確に把握することができません。正確にランキングするためには、コントロールサンプルの結合量に基づき、リガンドの最大結合量を考慮した結合量の補正を行います。

分子量補正をおこなっていないプロットで、リガンドの最大結合量を補正してください。補正をおこないたいプロットを表示します。 Tools の、Adjustment for controls...をクリックします。





Adjustment settings の Use adjustment for controls にチェックを入れます。

Positive control:	利用するポジティブコントロールを選択します。
Negative control:	利用するネガティブコントロールを選択します。 なお、ネガティブコントロールを選択しない場合には、Y=0 (RU) をネガティブコントロールとして補正します。
Fitting function:	フィッティングに利用する式を選択します。Linear（線形式）または Polynomial（多項式）を選択します。

ウインドウ右側に補正後のプロットが表示されます。ポジティブコントロールのフィッティングラインが Y 軸=100 で、ネガティブコントロールのフィッティングラインが Y 軸=0 で表示されます。

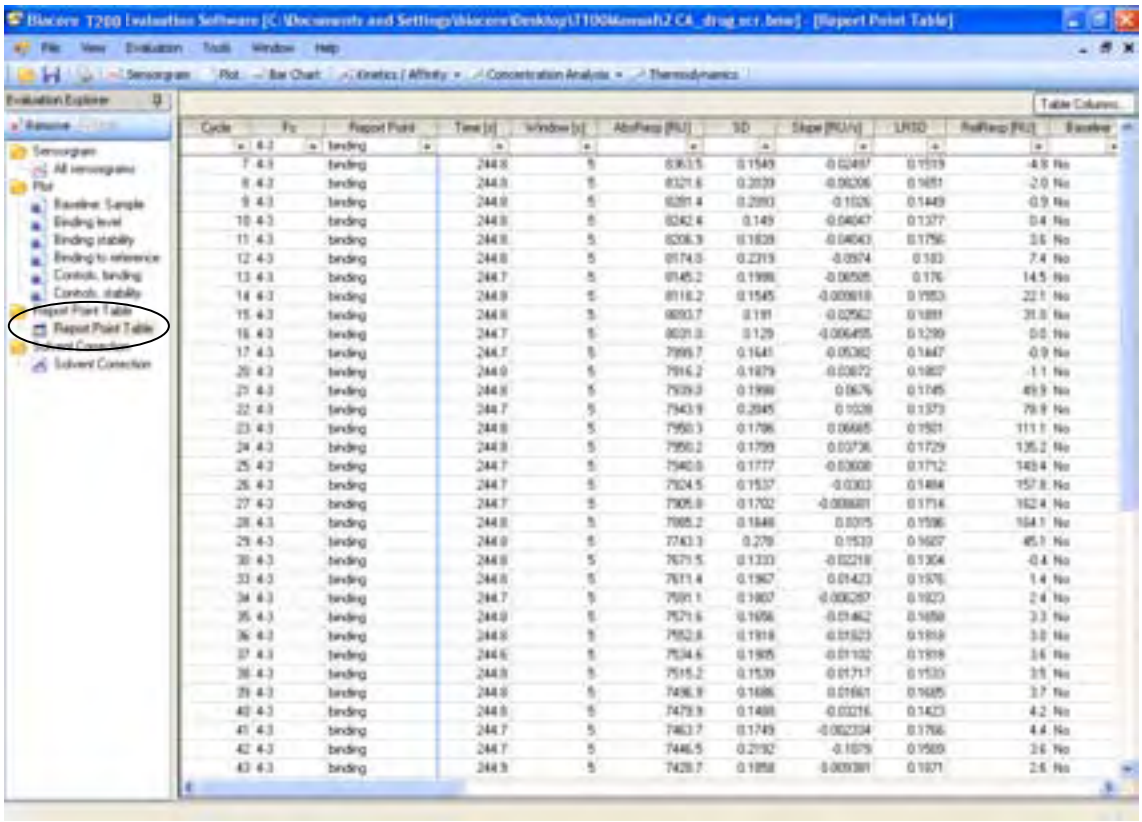
OK をクリックすると、補正後のプロットが表示されます。

レポートポイントテーブルを用いたランキングとピックアップ

Evaluation → Add Report Point Table...をクリックします。

↓

Evaluation Explorer に Report Point Table フォルダとファイルが追加され、Work area には、全測定サイクル分のデータが表示されます。



各カラム上部のフィルター▼を使用し、必要データを抽出します。

Fc	リファレンス差し引きデータ
Report Point	binding（結合レスポンスのレポートポイント名）
Assay Step	Sample（緩衝液添加サイクル等を除きます）

抽出終了後、RelResp [RU] を 2 回クリックします。

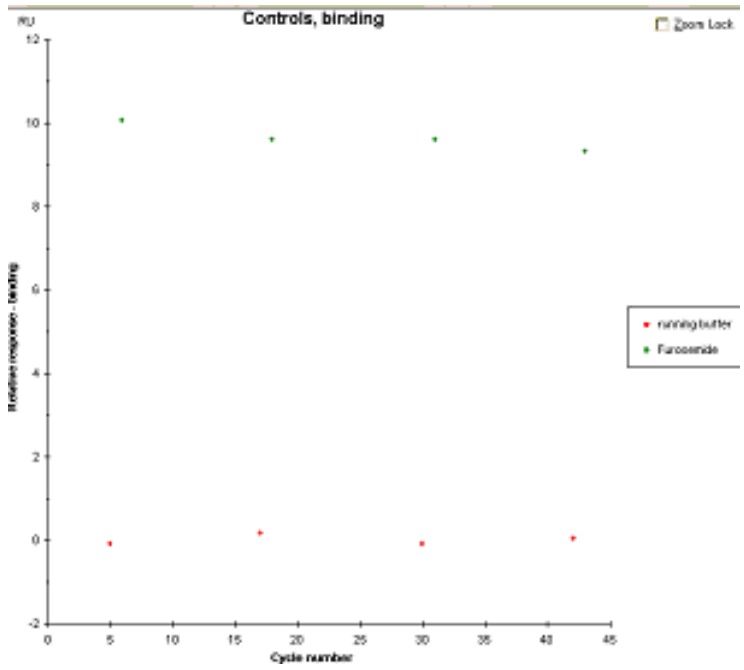
↓

結合レスポンスが高い順に並びます。

補足 1-9. クオリティーチェック

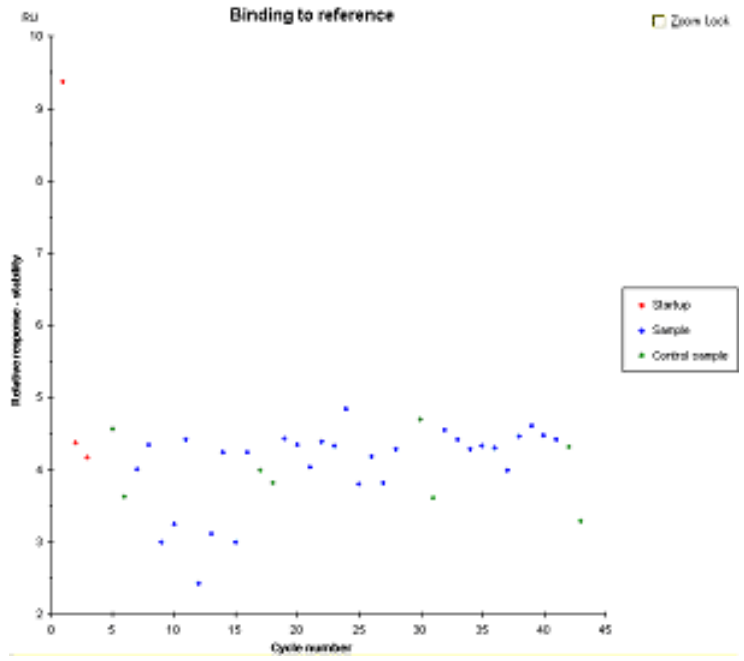
コントロールサンプルのレスポンスチェック

リガンドの安定性評価が目的で、定期的にコントロールサンプルを添加している場合、Evaluation Explorer 中の Plot フォルダに存在する controls: binding データでチェックします。



リファレンスセルへの非特異的吸着量チェック

Evaluation Explorer の Plot フォルダの Binding to reference データでチェックします。

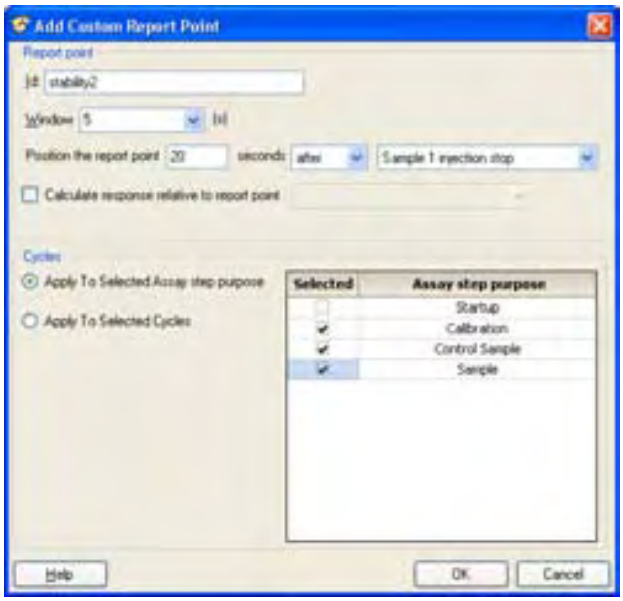


補足 1-10. レポートポイントの追加

Tools → Custom Report Points...をクリックします。

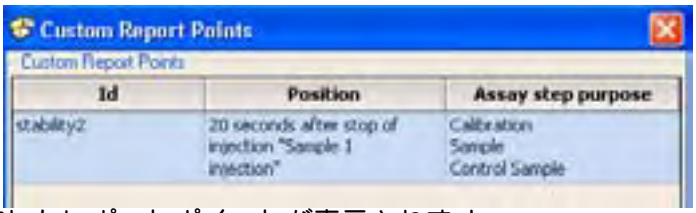
Add...をクリックします。

↓



Id にレポートポイントの名前を入力します。追加する位置を設定し、Cycles でどのサイクルで記録するか設定します。OK をクリックします。

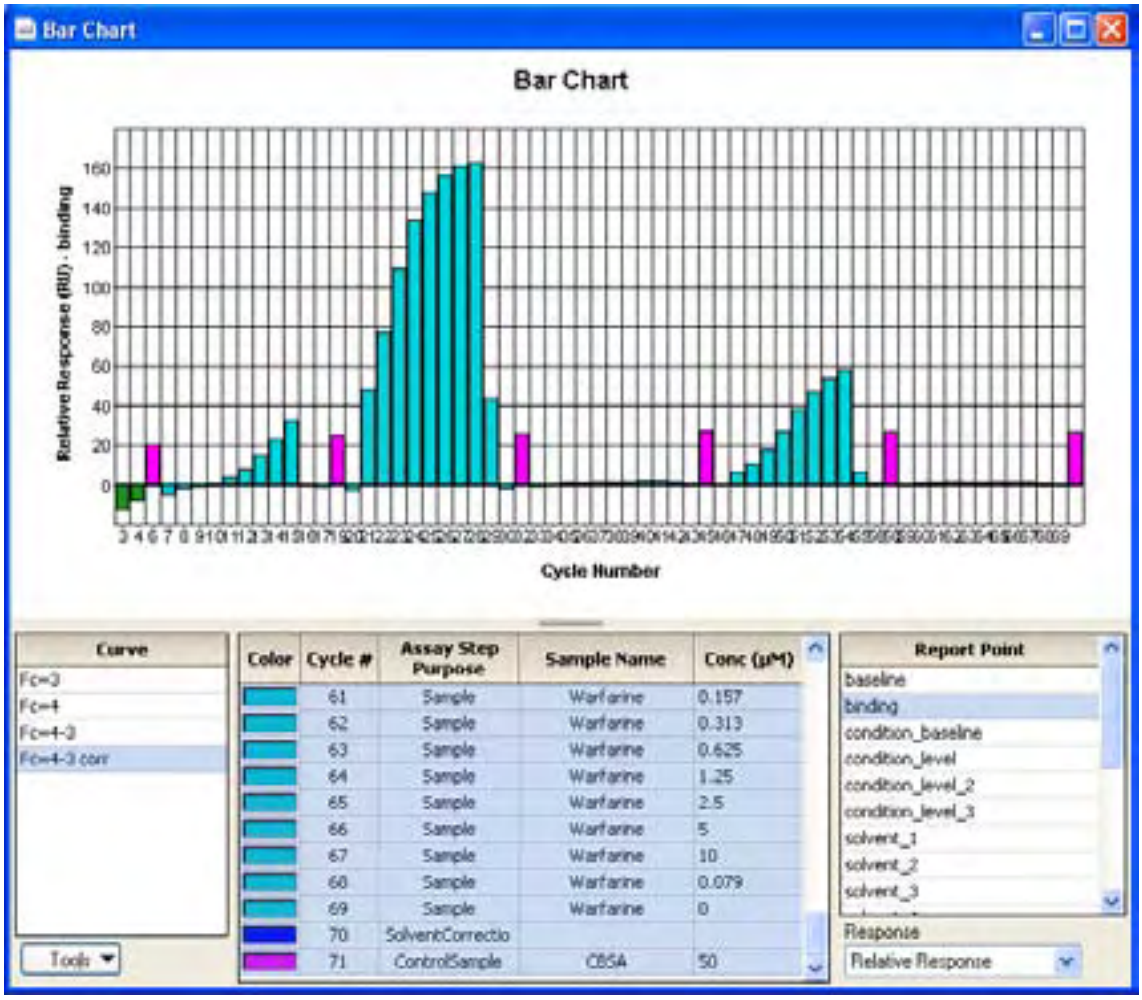
↓



初期画面に、追加したレポートポイントが表示されます。

補足 1-11. 結合量のグラフ化

結合量を棒グラフとして表示する場合には、Toolbar の Bar Chart をクリックします。



結合量が棒グラフとして表示されます。

Curve でグラフ化するセンサーグラムを選択します。複数選択も可能です。

表示方法、色、カラムラベルの表示を変更する場合には、Tools をクリックして変更したい項目を選択します。

2. 低分子化合物アナライトの相互作用測定

低分子化合物の溶解性の問題で有機溶媒を利用する場合には、一般的なタンパク質-タンパク質相互作用測定と異なり、ランニング緩衝液およびサンプル調製に注意が必要です。また、測定結果を評価するにあたり溶媒効果の補正が必要となります。

アナライトの調製

アナライト溶液の DMSO の終濃度をランニング緩衝液と合わせます。化合物濃度は結合スクリーニングが目的の場合、親和性にもよりますが数十 nM～数 μM で調製します。反応速度定数の算出が目的の場合、K_D（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度範囲で 5 濃度以上調製します。

ランニング緩衝液

PBS や HEPES 緩衝液が広く利用されます。HEPES は、ヒト血清アルブミンへの結合が見られるので注意してください。

有機溶媒を利用する場合には、DMSO 含有緩衝液を使用することが多いです。DMSO 濃度は 5%程度以下を推奨します。DMSO 濃度はリガンドの活性や化合物の溶解性を考慮し決定します。ランニング緩衝液に使用できる DMSO 濃度は 10%までとなります。

非特異的吸着を抑える目的で、終濃度 0.05%程度の界面活性剤（Surfactant P20 など）を添加することもあります。

補足 2-1. ランニング緩衝液調製の注意事項

弊社販売の PBS 10X バッファー（1 x 1000 ml, BR-1006-72）は pH 調製済みです。

0.1M phosphate Buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl

⇒超純水で 10 倍希釈後、DMSO を加えます。

0.01 M phosphate Buffer, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, 5% DMSO, pH7.4

ランニング緩衝液は用事調製してください。

DMSO を扱う際には、耐性材質の容器を使用します。（プラスチック容器は使用不可）

DMSO を含む緩衝液をろ過する際には、フッ素樹脂製またはナイロン製のフィルター（0.22 μm）を用います。酢酸セルロース製のものは避けてください。DMSO 溶液中の混合物も測定に影響をおよぼす場合があるのでグレードの高いもの（UV spectrometry 用等）を使用してください。なお、DMSO 混合による pH 変動は大きいため、DMSO 混合後の pH を考慮してください。

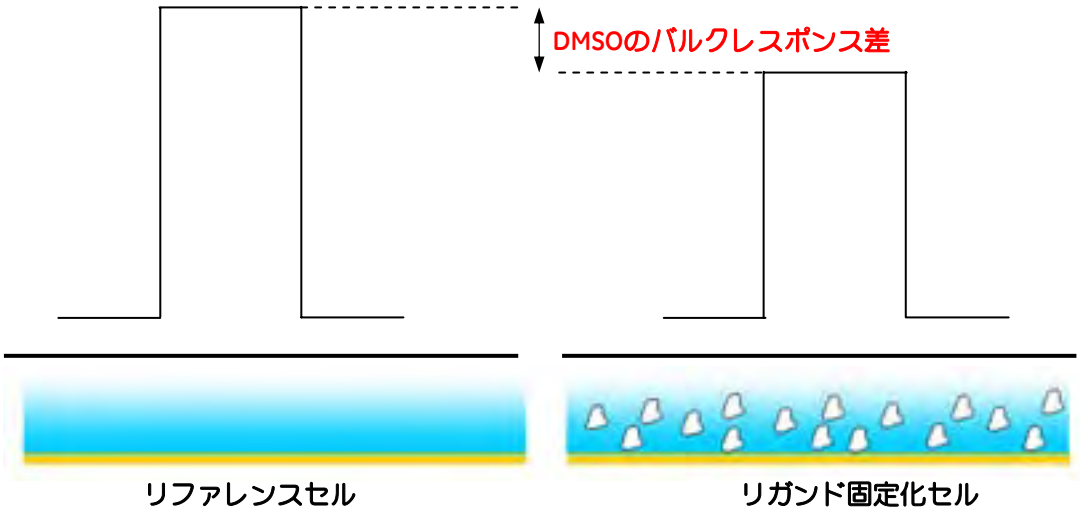
きれいなガラスボトルに保存し、装置にセットする直前までキャップはしっかり閉めてください。装置のボトルポジションにセットする際は必ず付属のスクリューキャップを使用してください。

溶媒補正

SPR のシグナルはセンサーチップ表面での様々な屈折率（RI）の変化を反映しています。センサーチップ表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液とサンプルを溶解している溶媒の屈折率の差、すなわち、溶媒（バルク）効果レスポンスが含まれます。

溶媒効果が小さい（100 RU 以下）実験では、リガンド固定化セルからリファレンスセルのレスポンスを差し引くだけでこのバルクレスポンスは排除できます。

しかし、厳密には、リガンド固定化セルに添加した溶液は、リガンド分子の占有体積分排除されるため、リファレンスセルのバルクレスポンスは、リガンド固定化セルよりも高くなります。



ランニング緩衝液とアナライト溶液中の DMSO 濃度 1%の違いは約 1,500 RU のバルクレスポンスに相当します。複数あるサンプルを個々に調製する際、DMSO 濃度の誤差が無視できないバルクレスポンスの差を生む可能性があります。

このように、溶媒効果が大きい DMSO を用いる実験では、単純に差し引くだけではバルクレスポンスの差を十分に排除することはできません。実際、このバルクレスポンスの差は小さくても（通常 10 RU 以下）、低分子化合物が結合した際に得られる結合レスポンスと同程度であるため、バルクの差を補正する必要があります。

溶媒補正は以下の 3 つの要因が重複した際必要となります。

- 期待されるアナライトの結合レスポンスが小さい（100 RU 以下）場合
- リガンドを高密度（10,000 RU 以上）に固定化した場合
- サンプル溶液に DMSO が含まれるなど、バルクレスポンスが大きく（3000 RU 以上）、サンプル間で値が異なる場合（DMSO 濃度の“誤差”も含めて）

補足 2-2. 溶媒補正の方法

溶媒補正の手順

Biacore T200 Evaluation Software では、自動で以下の補正を実施します。

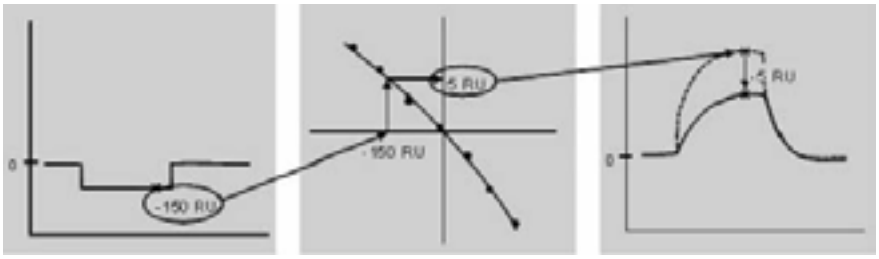
測定の際に、DMSO 溶液の濃度シリーズ（ランニング緩衝液に含まれる DMSO 濃度±1 %程度）を、リガンド固定化セルおよびリファレンスセルに添加し、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を記録します。

リファレンスセルのレスポンスを x 軸、固定化セルとリファレンスセルのバルクレスポンスの差を y 軸にプロットして溶媒補正用曲線を作成します。

低分子化合物を添加した際、リファレンスセルのレスポンス（図①）を溶媒補正用曲線に代入して、補正値を算出します（図②）。

相互作用測定で得られた結合レスポンスから補正値を差し引きます（図③）。

①　　②　　③



溶媒補正用 DMSO 溶液の調製例

5 % DMSO 含有サンプルを用いる場合の溶媒補正用 DMSO 溶液の作成方法を記載します。

すべての DMSO 溶液は用事調製します。

①1x PBS（no DMSO）を調製します。

②溶媒補正用曲線 4 %、6% DMSO ストック溶液を調製します。

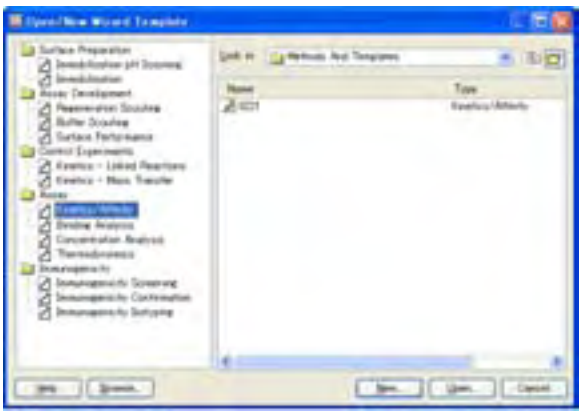
4% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9,600 µl
	100 % DMSO	400 µl
		10,000 µl
6% DMSO ストック溶液	1x ランニング緩衝液	9,400 µl
	100 % DMSO	600 µl
		10,000 µl

③ストック溶液を下記表の割合で混合して、4 %～6 %の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製します。以下の表は 8 段階の溶媒補正用 DMSO 溶液を調製する際のプロトコールです。

4% DMSO		100	200	300	400	500	600	700	
6% DMSO	700	600	500	400	300	200	100		
	700	700	700	700	700	700	700	700	(µl)

2-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の Run → Wizard...をクリックします。



Assay → Kinetics/Affinity を選択した後、New...をクリックします。以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、Open...をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、Browse...をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして Open...をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。

Detection

Flow path　2-1 もしくは 4-3 を選択します

Chip

Chip type　利用するセンサーチップを選択します

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドを捕捉する場合にチェックを入れます。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされます。

Sample

アナライトの添加コマンドです

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れます。添加回数の選択が可能です（1 or 2）

Carry Over

アナライトのキャリーオーバーを確認する場合にチェックを入れます

Next >をクリックします。

↓

Conditioning

Solution　再生溶液または緩衝液の名称

contact time　添加時間（s）

Number of injections　添加回数

Startup

Solution　指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施します。通常は、ランニング緩衝液を

用います。

Number of cycles　サイクル数を設定します。3 回以上を推奨します。

Solvent correction

溶媒補正を実施する場合にチェックを入れます。

Number of injections　溶媒補正の測定点を選択します。何サンプルごとに溶媒補正を実施するかを、"Repeat after ☐ Sample cycles"で指定します。

Next >をクリックします。

↓

Sample

contact time	アナライトの添加時間	120 s
Flow rate	流速	30 µl/min
Dissociation time	解離時間	120 s

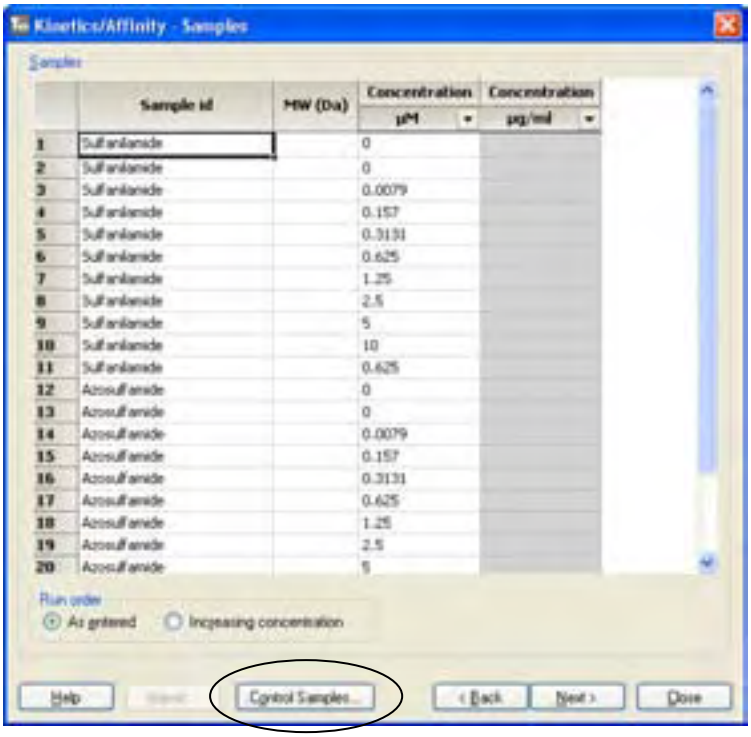
Extra wash after injection with

アナライト添加後に、指定した溶液でフローセル以外の流路を洗浄したい場合にチェックを入れます。センサーチップ表面には流れません。

Stabilization period　添加後のベースライン安定化時間　0 s
（必要に応じて設定します。）

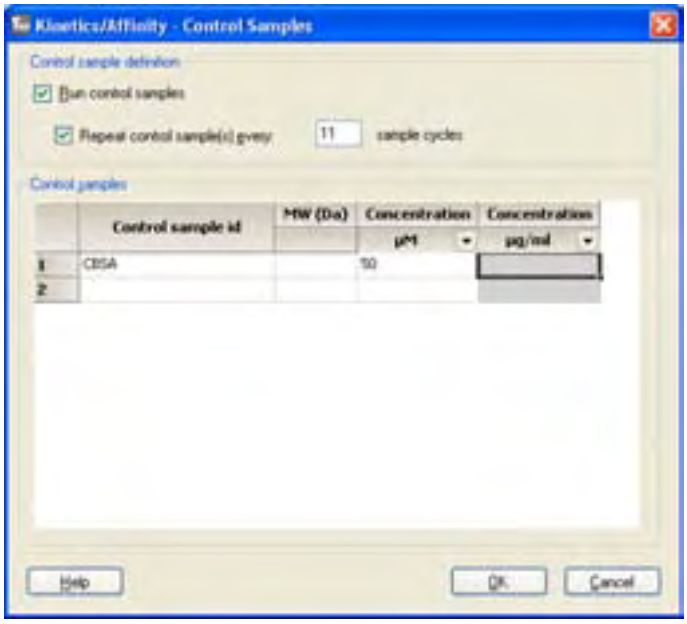
入力後、Next >をクリックします。

↓



Sample id	アナライトの名称
MW　(Da)	アナライトの分子量
Concentration	アナライトの濃度（単位も選択） 分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度 nM ”と“重量濃度 μg/ml”を換算します。

コントロールサンプルを定期的に添加する場合は、Control Samples...をクリックします。



Control Sample definition

コントロールサンプルを測定する場合に Run control Samples にチェックを入れます。

Repeat control Sample（s）　every　何サンプルごとにコントロールサンプルを測定するか指定します。

Control Samples

テーブルにコントロールサンプルの情報を入力します。

入力後、Next >をクリックします。

補足 2-3. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力します。

↓

測定を始める前の Prime および Normalize の実施を選択します。

Temperature settings

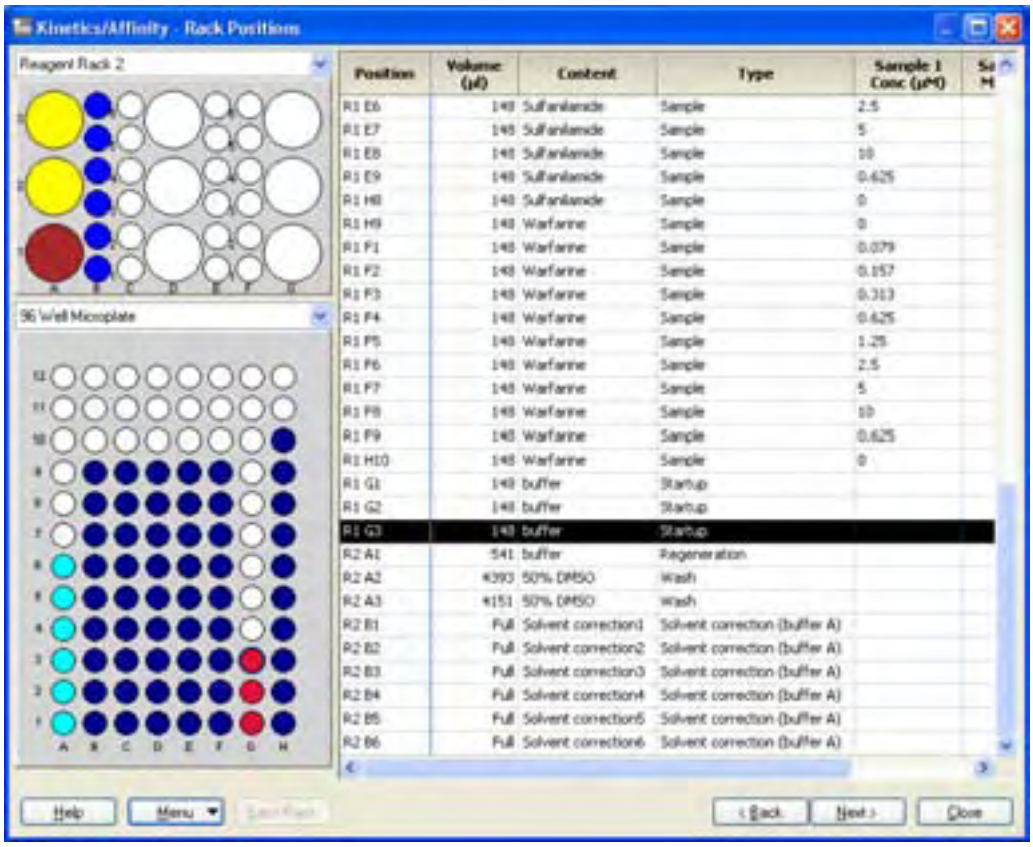
Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

Cycle Run List...をクリックすると、測定サイクルのリストが表示されます。

Cycle	Assay step name	Sample 1 Solution	Sample 1 Conc (µM)	Sample 1 MW (Da)
1	Startup	buffer		
2	Startup	buffer		
3	Startup	buffer		
4	Solvent correction			
5	Control Sample	CBSA	50	
6	Sample	Sulfanilamide	0	
7	Sample	Sulfanilamide	0	
8	Sample	Sulfanilamide	0.0079	
9	Sample	Sulfanilamide	0.157	
10	Sample	Sulfanilamide	0.3131	
11	Sample	Sulfanilamide	0.625	
12	Sample	Sulfanilamide	1.25	
13	Sample	Sulfanilamide	2.5	
14	Sample	Sulfanilamide	5	
15	Sample	Sulfanilamide	10	
16	Sample	Sulfanilamide	0.625	

Next >をクリックします。

↓



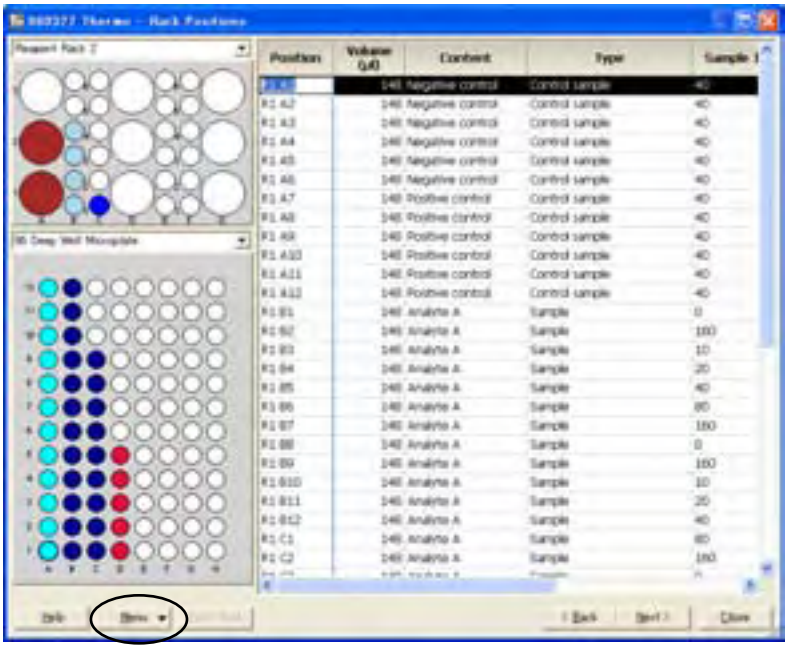
右側の表でサンプルの位置と容量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 2-4. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import...でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

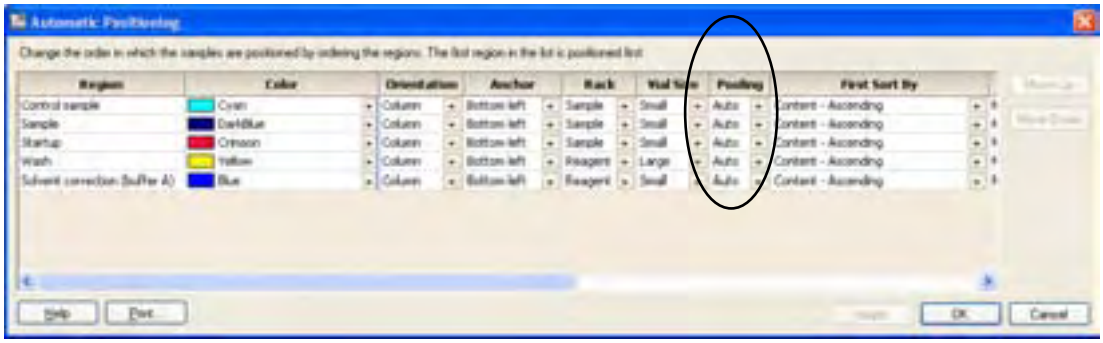
補足 2-5. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。



Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することが出来ます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

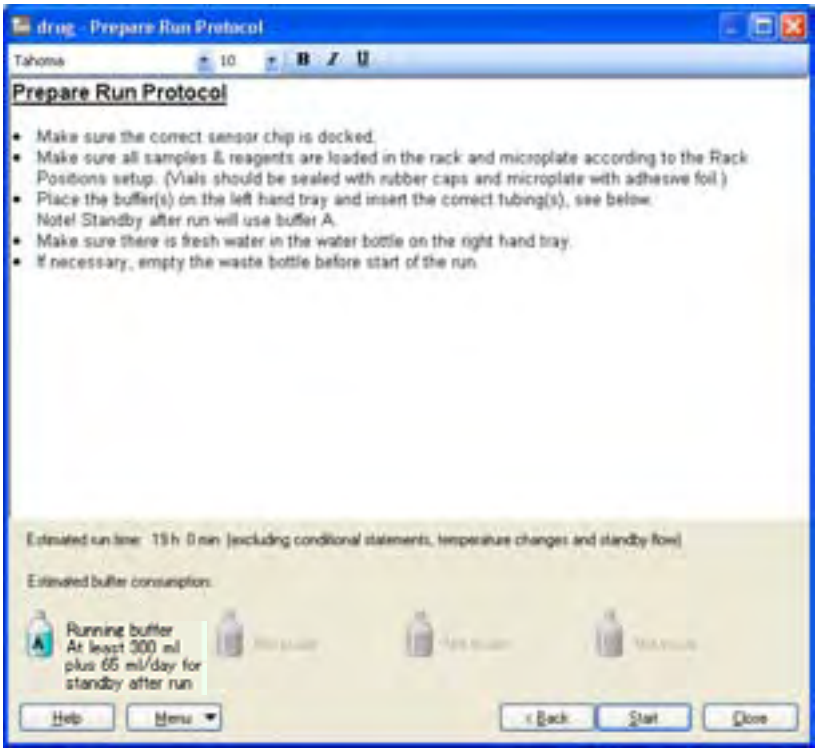
なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、OK をクリックします。
Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の Next >をクリックします。

↓

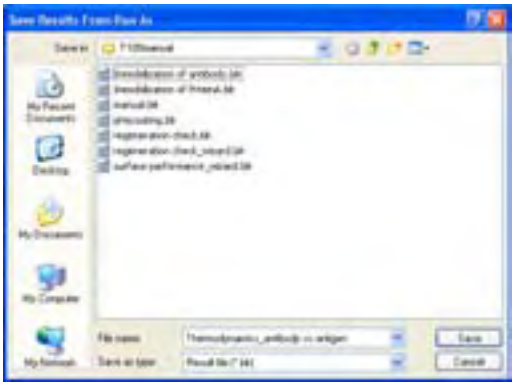

drug - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 15 h 0 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
At least 300 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don't Save を選択します。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定がスタートします。

↓

測定終了後、装置は Standby flow 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動します。

補足 2-6. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックします。

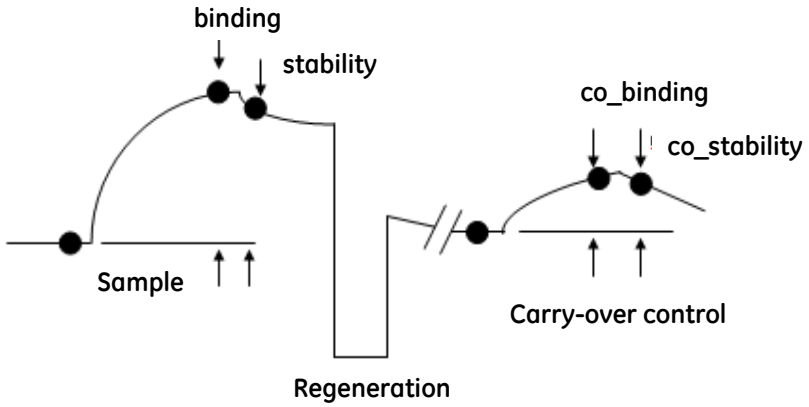
ボックス中の Stop Run をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

補足 2-7. レポートポイントの設定

溶媒（バルク）補正を必要とする実験では、低分子アナライトのバルクレスポンスを測定するために、アナライト添加中（添加終了直前）にレポートポイントを取得する必要があります。自動取得されるレポートポイントの名前は binding と付いています。添加終了直後のレポートポイントは stability として取得されます。また、低分子アナライト特有のニードル、流路等へのキャリーオーバーチェックのために、アナライト添加終了後、ランニング緩衝液をアナライトと同等のモードで添加する際に取得されるレポートポイントの名前は、頭に co-が付けられています。



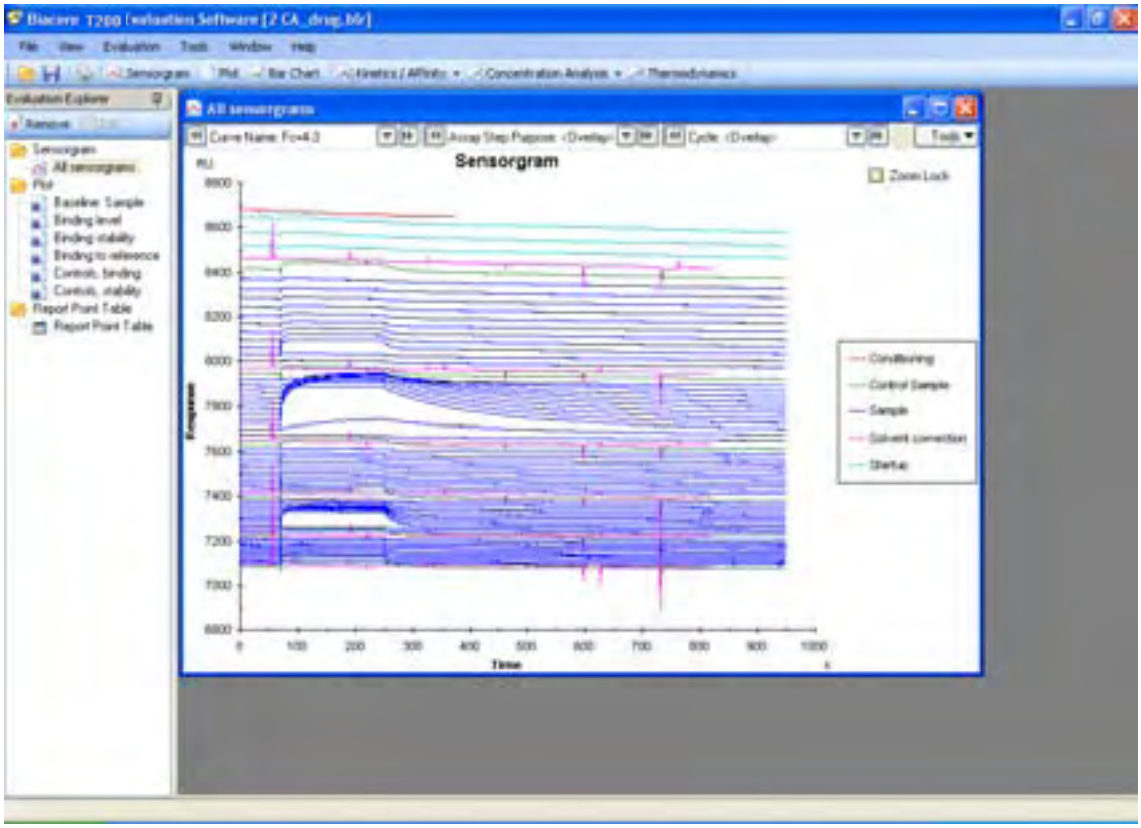
補足 2-8. キャプチャー法を利用した低分子化合物の測定

Wizard の Binding analysis および Kinetics / Affinity では、溶媒補正曲線の測定を、リガンドをキャプチャーせずに実施します。リガンドキャプチャー後のベースラインドリフトが小さく、一度リガンドをキャプチャーした表面で連続してアナライトの測定を実施する場合には、Wizard のキャプチャー機能を利用した測定が実施できます。

ただし、キャプチャー後のベースラインドリフトが大きく、アナライトごとにリガンドをキャプチャーする場合は、溶媒補正曲線の測定はリガンドキャプチャー後の表面で実施してください。この際、測定プログラムはメソッドで作成する必要があります。メソッド作成については、Biacore T200 日本語取扱説明書 -基本操作編-を参照してください。

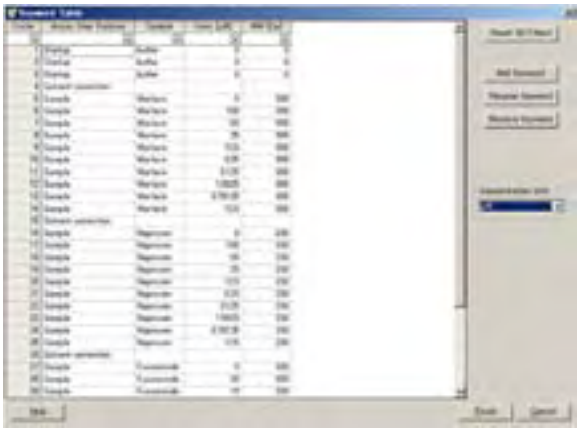
2-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。（反応速度定数・解離定数算出は、溶媒補正後に解析します。解析方法は、Biacore T200 日本語取扱説明書 -基本操作編-を参照してください。）

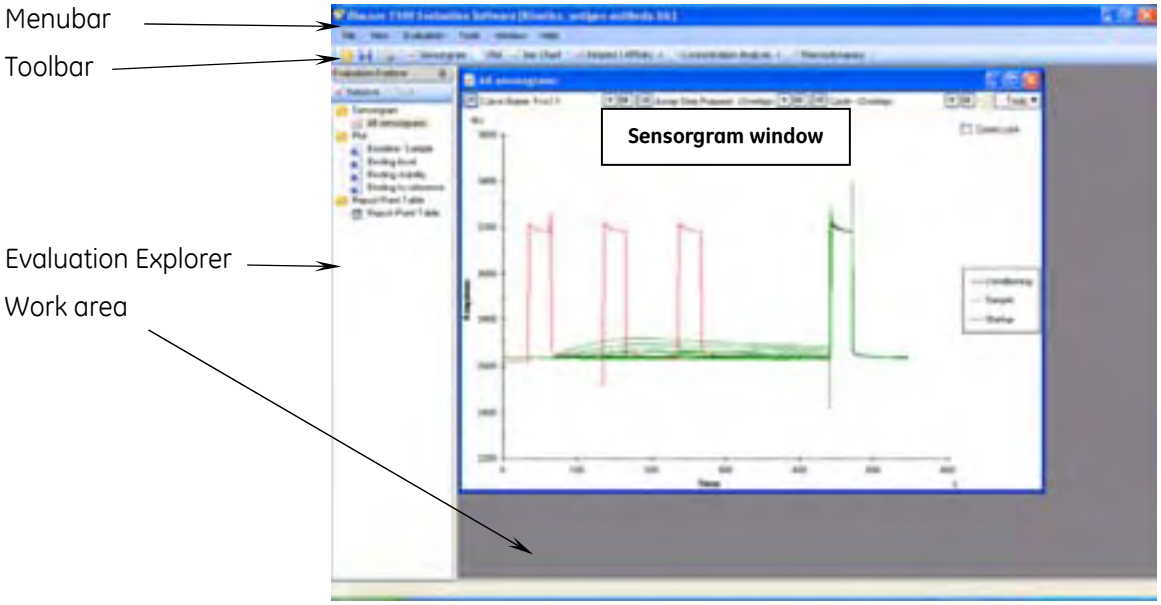


補足 2-9. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table...で変更します。Tools... → Keyword Table...をクリックします。ただし、リガンド名の変更はできません。



補足 2-10. 画面の説明

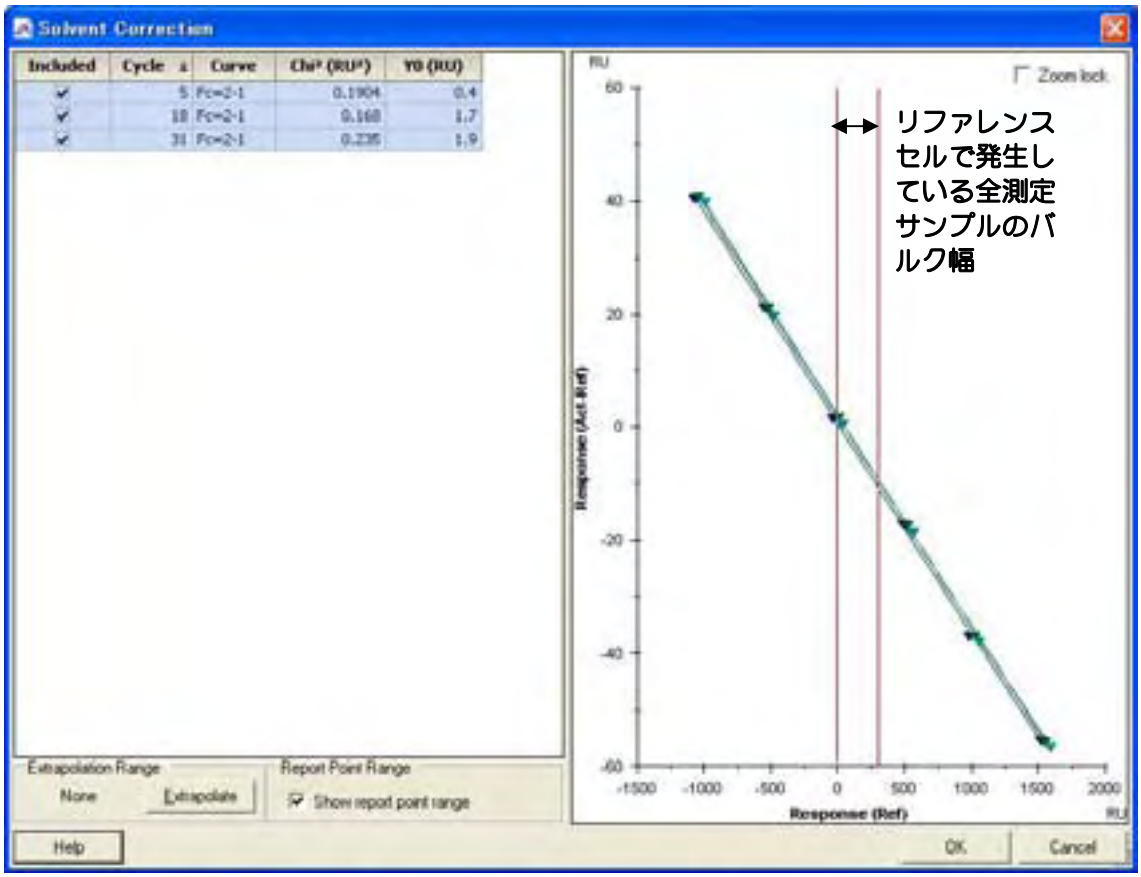


Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

溶媒補正

Evaluation → Add Solvent correction...をクリックします。

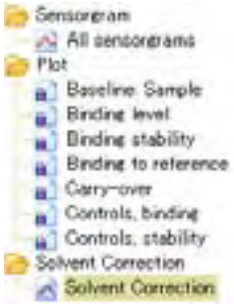
測定サイクル中の溶媒補正用曲線が表示されます。



テーブルで利用する補正曲線にチェックを入れます。

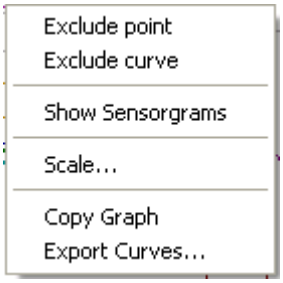
OK をクリックすると補正が完了します。

溶媒補正用曲線は、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。



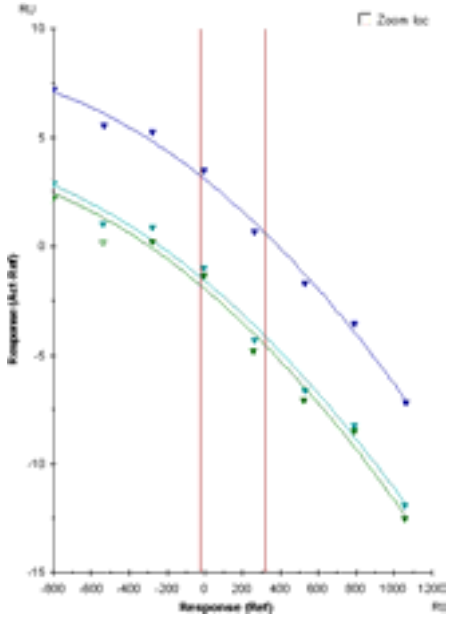
補足 2-11. 測定ポイントの削除

エアーの混入などの理由で、溶媒補正用曲線から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックします。



Exclude point をクリックします。

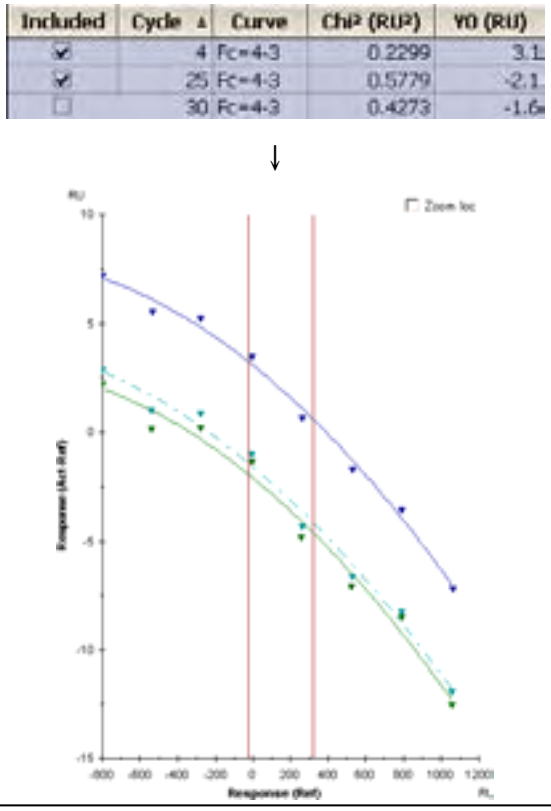
↓



測定ポイントが削除されます。同時に、改めて残りの測定ポイントで溶媒補正用曲線が作成されます。

補足 2-12. 溶媒補正用曲線の削除

エアーの添加などの理由で解析から削除したい溶媒補正用曲線がある場合、目的の溶媒補正用曲線について、Solvent correction 左のボックスの Included カラムのチェックを外します。溶媒補正用曲線は削除されます。

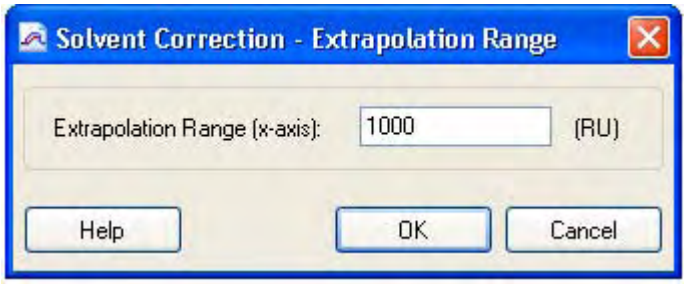


補足 2-13. 溶媒補正用曲線の延長

サンプルもしくは溶媒補正用 DMSO 溶液の調製の問題で、測定サンプルのバルクレスポンスが溶媒補正用 DMSO 溶液の範囲内に収まらなかった場合に、溶媒補正用 DMSO 溶液の濃度幅（＝リファレンスセルに対するバルク幅）を広げることができます。ただし、延長された溶媒補正用曲線の領域での補正は、実測値とは異なるため、最終結果には注意が必要です。

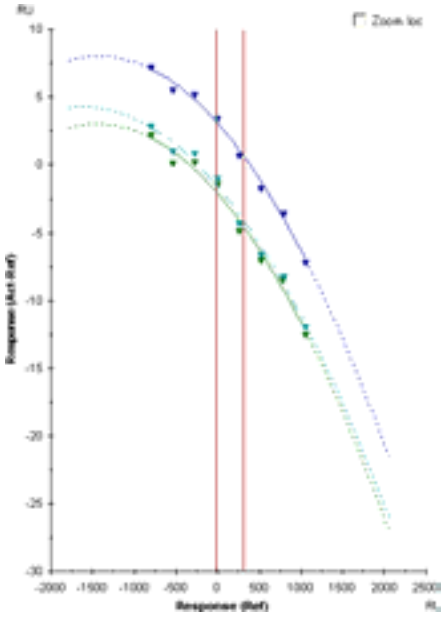
Solvent correction 左下の Extrapolate をクリックします。

↓



延長する幅を入力します。実際の溶媒補正用曲線の測定幅の 10 %を超えないことが望ましいです。OK をクリックします。

↓



データの評価

ヒット化合物のランキング評価は、1. 結合の有無の確認、スクリーニングを参照してください。低分子化合物アナライトの場合、化合物の分子量差の影響が大きいため、分子量補正をすることにより、真の結合の強さを評価します。

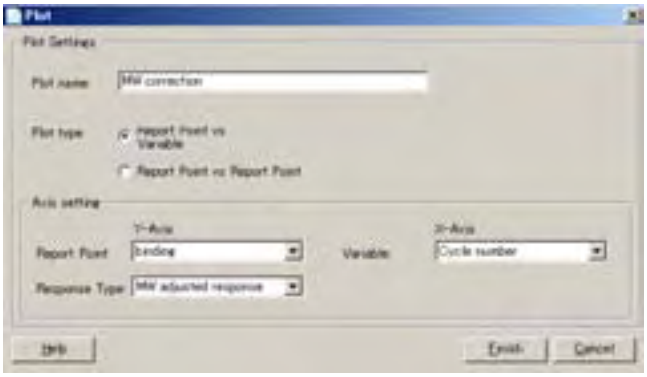
分子量補正

結合レスポンスを分子量で割り、さらに 100 を掛けた値が補正値です。

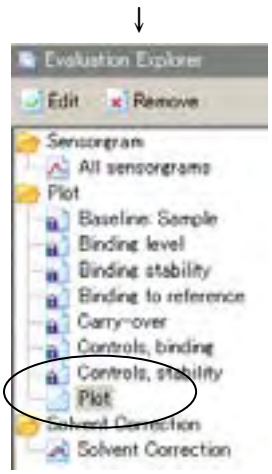
Evaluation → Add Plot...をクリックします。

↓

Plot name	プロットデータの名称（例；MW correction）
Plot type	プロット様式の設定（Report Point vs Variable）
Axis setting	Y 軸の設定（Report Point：binding、Response type：MW adjustedresponse）
	X 軸の設定（Variable：Cycle number）

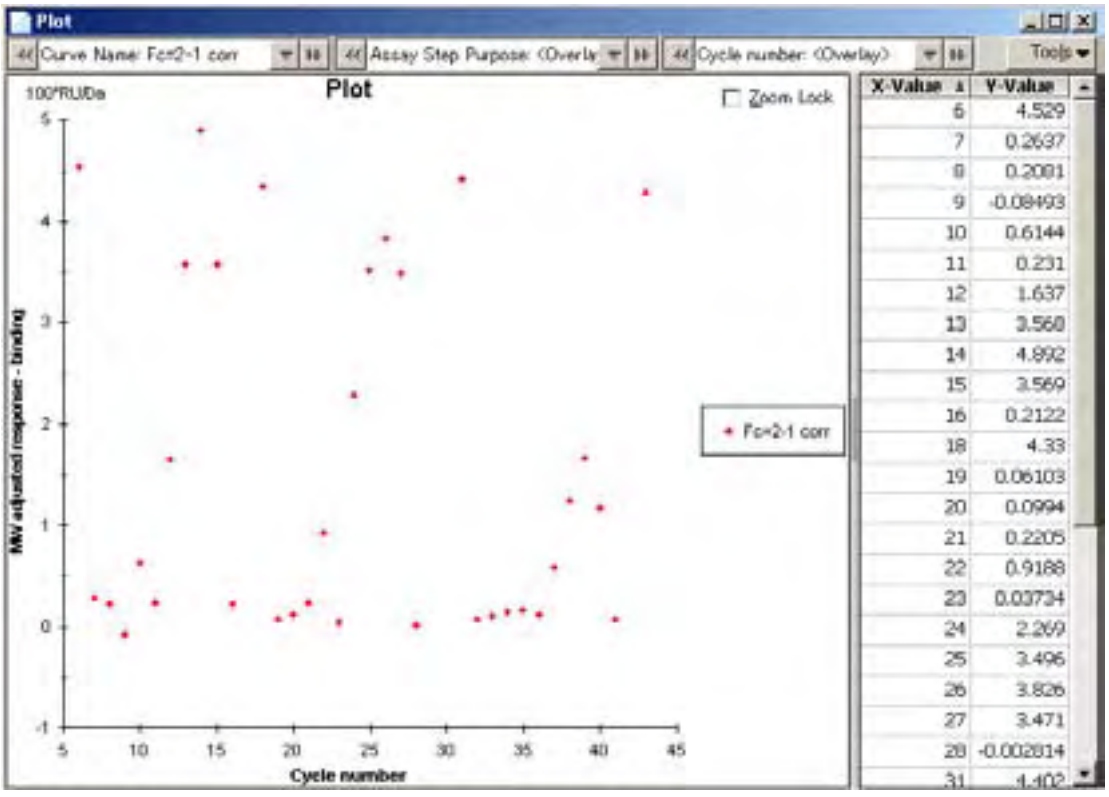


Finish をクリックします。



Evaluation Explorer の Plot フォルダに反映されます。
ファイル名は、自動で Plot と入力されるので、任意で変更します。

Work area には、分子量補正されたデータが表示されます。
Y 軸の単位は、100×RU/Da となります。



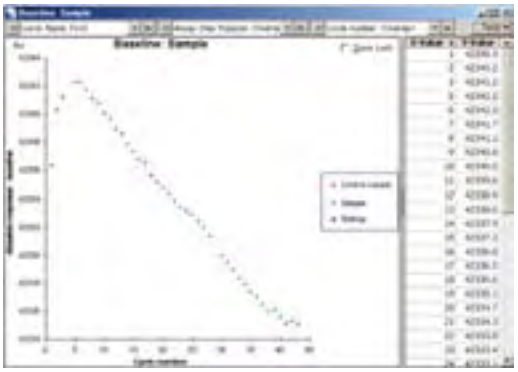
評価の詳細は、1. 結合の有無の確認、スクリーニングを参照してください。

補足 2-14. 測定結果の正当性の評価

Evaluation Explorer の Plot を用いて、得られたデータの信頼性があるかどうかを評価します。

ベースラインの変動

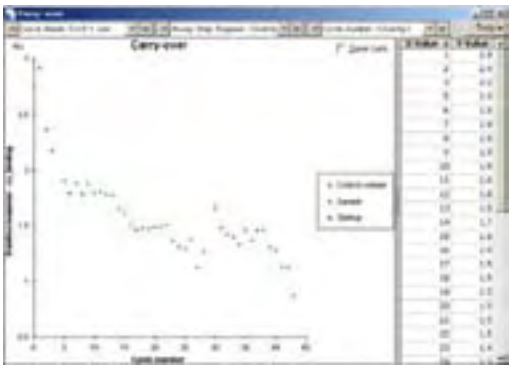
Baseline: Sample プロット



全測定サイクルの baseline の絶対値に対するプロットが表示されます。物理吸着しているリガンドがサイクルごとに脱離している場合、右肩下がりになりますが、ポジティブコントロールサンプルのレスポンスが確認できていれば問題ありません。ポジティブコントロールがない場合、全サイクルの総変動量（RU）が固定化量の10%以上である場合には、それを考慮して評価する必要があります。

キャリーオーバーチェック

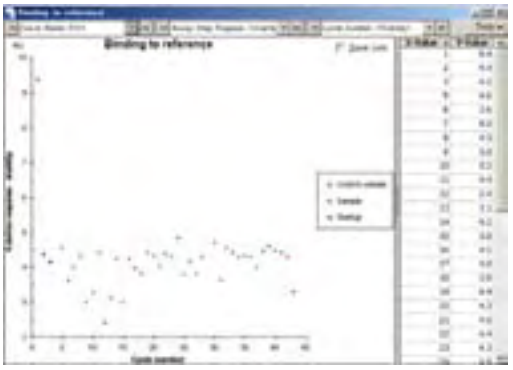
Carry Over プロット



co_binding の co_baseline に対する相対値プロットが表示されます。ランニング緩衝液のレスポンス（画面では Startup サイクル）に対して、レスポンスの大きいアナライトはニードルや流路等に吸着する性質を持ちます。キャリーオーバーが激しいアナライトの次のサイクルの結合レスポンスは、それを考慮して評価する必要があります。

リファレンスセルへの非特異吸着の確認

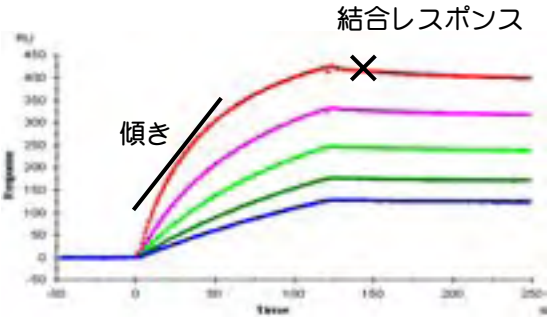
Binding to reference プロット



Stability の baseline に対する相対値のプロットが表示されます。ランニング緩衝液のレスポンスを基準として評価します。ランニング緩衝液のレスポンス以上のサンプルは、センサーチップ表面へ非特異的に吸着している可能性があります。それを考慮した上で評価してください。

3. 濃度測定

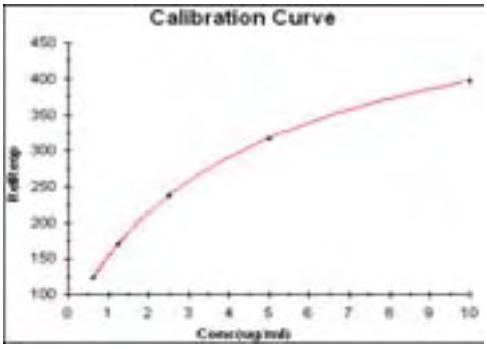
3-1. 検量線を利用した濃度測定



Biacore による濃度測定では、定量したい分子（A）に対して親和性を持つ分子（B）が必要となります。B を固定化したセンサーチップ表面に A を添加すると、添加した濃度に依存した結合レスポンス（RU）が得られます。数段階の濃度既知の A を添加し、その結合レスポンスを得て、検量線（RU vs C）を作成します。濃度未知の A に対しても同様に添加し、その結合レスポンスを検量線にフィッティングすることにより濃度を算出します。
また、A 添加直後のセンサーグラムの傾き（Slope）も、結合レスポンス同様に添加している A の濃度を反映した値となるため、Slope vs C の検量線からでも定量をすることができます。

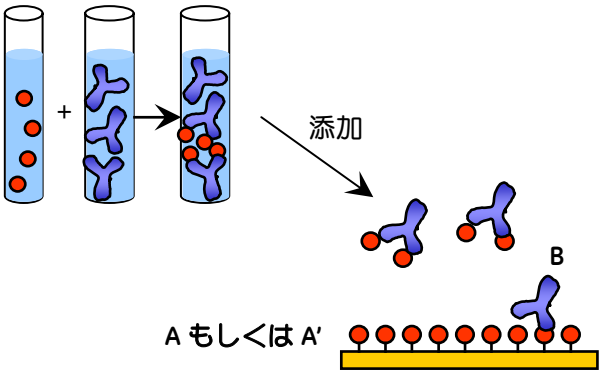
直接法と阻害法

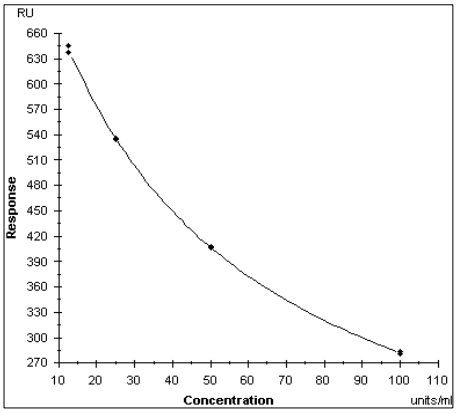
親和性を持つ分子（B）をセンサーチップ表面に固定化し、定量分子 A を添加して得られる結合レスポンスから直接 A の濃度を算出する方法を直接法と呼びます。それに対し、化合物やペプチドなど分子量が小さい分子を定量する場合は A もしくは A のアナログ（A'）をセンサーチップに固定し、定量分子 A と A に対して親和性を持つ分子 B を一定量混合した混合液を添加し、未反応の B を定量することにより、混合液中に存在する A を逆算する定量法を阻害法と呼びます。



直接法による検量線

阻害法



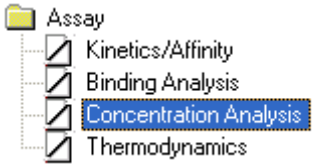


阻害法による検量線

3-1-1. プログラムの実行

濃度測定では、原則としてリファレンスセルを設定しません。評価に用いる結合量として、溶液効果の影響を受けない解離領域における結合量を利用するためです。なお、非特異的吸着を差し引く等の目的で、リファレンスセルを設定する場合には、あらかじめウィザードの Concentration Analysis のテンプレートで作成したメソッドをメソッドビルダーで開き、リファレンスセルを設定をした上で測定を実施してください。

Toolbar の Run Wizard アイコン（ または Menu bar の Run → Wizard...をクリックします。



Assay → Concentration Analysis を選択した後、New...をクリックします。以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、Open...をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、Browse...をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして Open...をクリックします。

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。

Detection

Flow path　目的のフローセルを選択します。リファレンスセルの差し引きはできません。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップを選択します。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドを捕捉する場合にチェックを入れます。

Sample

アナライトの添加コマンドです

Enhancement

2 次抗体などを添加する場合にチェックを入れます

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れます。添加回数を選択してください。(1 or 2)

Next >をクリックします。

↓

Startup

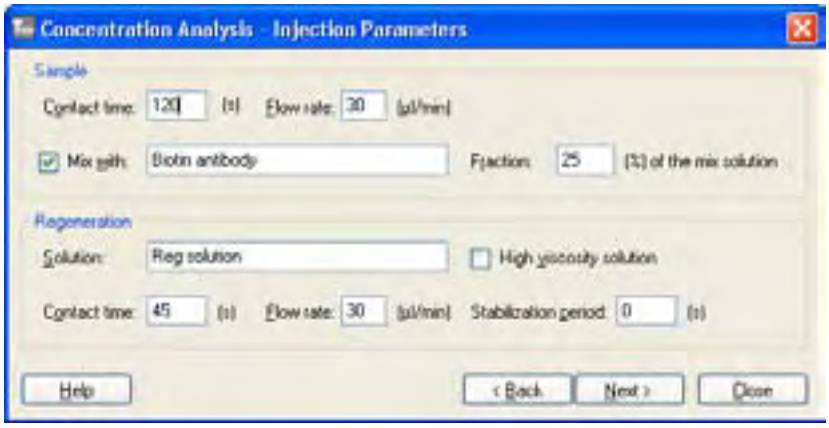
指定した溶液（通常、ランニング緩衝液）で、サンプル測定と同様の工程をサンプル（アナライト）測定前に実施します。

Solution　溶液名

Number of cycles　サイクル数。3 回以上を推奨します。

Next >をクリックします。

↓



Sample

contact time	アナライトの添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Mix with	チェックを入れると、測定直前にサンプルと混合溶液を自動混合します（阻害法による定量の場合に使用します）。Fraction に混合後の溶液に対する、混合溶液の割合（%）を入力します。 （例）75%と入力した場合：サンプル 25%、混合溶液 75%

Regeneration

Solution	再生溶液の名称
High viscosity solution	粘性の高い溶液（40% エチレングリコール以上）の場合はチェックを入れます。
contact time	再生溶液の添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Stabilization perion	添加終了後のベースライン安定化時間（s）

Next >をクリックします。

↓

Calibration Curve

Analyte name	アナライト（既知濃度サンプル）の名称
Run first	検量線測定を測定の初めに実施するよう予め設定されています。
Repeat calibration every	検量線作成頻度。 指定したサンプル数ごとに検量線を実施します。チェックを入れない場合には、サンプル測定前に 1 度検量線を測定します。
Run last	検量線測定を測定の最後に実施するかを設定します。

Calibration points

Concentration	単位をプルダウンで選択して、濃度を入力します。 6 段階濃度以上、測定回数 2 回以上の繰り返し測定を推奨します。 テーブルに入力した順番で測定は実行します。

Next >をクリックします。

↓

Control Sample definition

Run control Samples

コントロールサンプルを測定する際にチェックします

Repeat control Sample（s） every

測定頻度を入力します

コントロールは 20 サンプル程度ごとに入れます

Control Samples

Control Sample id　コントロールサンプルの名称

Expected conc.　コントロールサンプルの濃度

Next >をクリックします。

↓

Sample id	サンプルの名称
Dilution factor	サンプルの希釈倍率

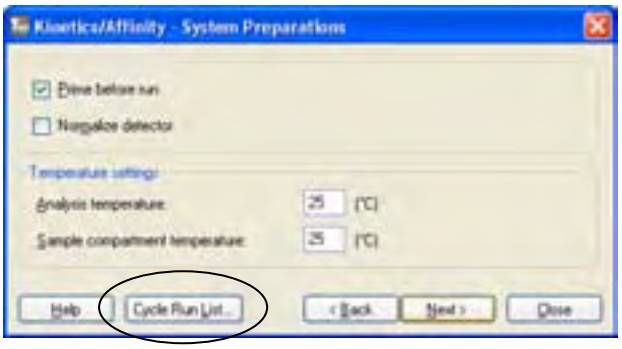
テーブルに入力した順番で測定します。

Next >をクリックします。

↓

補足 3-1. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

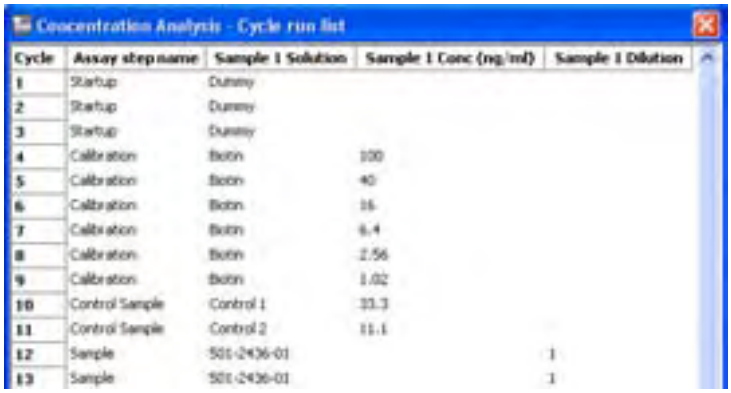
Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力します。



測定を始める前の Prime および Normalize の実施を選択します。

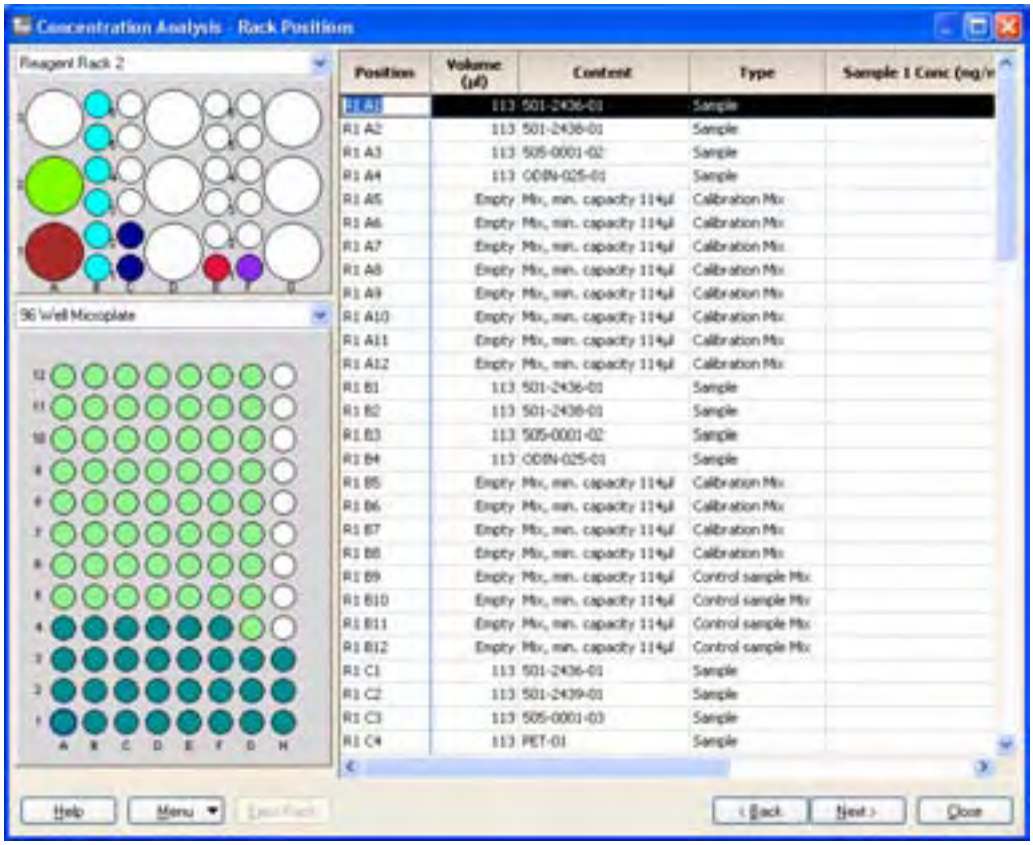
Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

Cycle Run List...をクリックすると、測定サイクルを確認できます。



Next >をクリックします。

↓



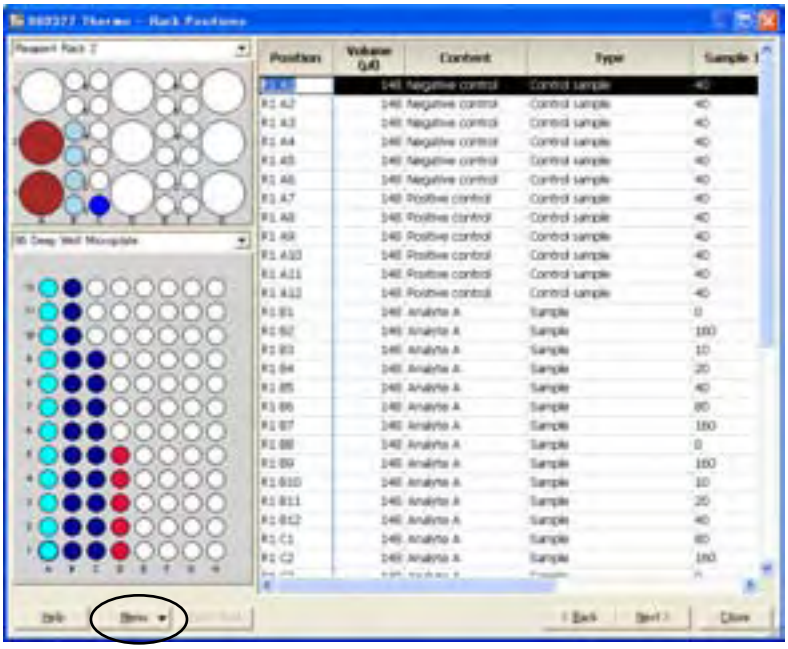
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 3-2. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import... でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

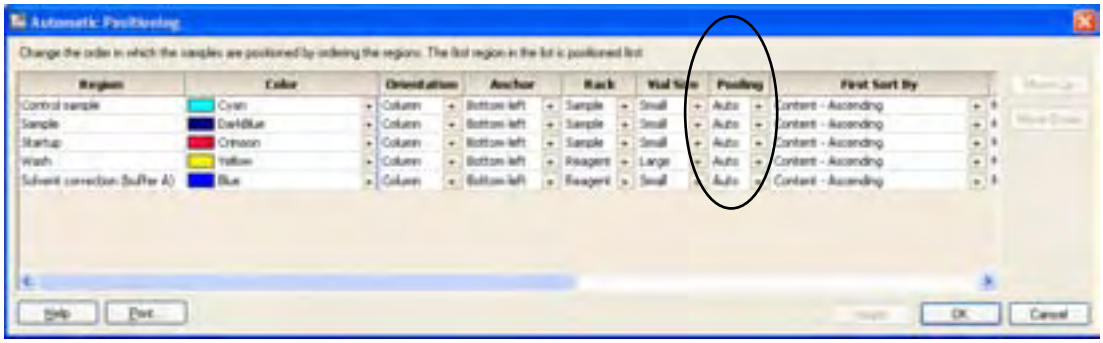
補足 3-3. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。



Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することができます。
“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。
同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

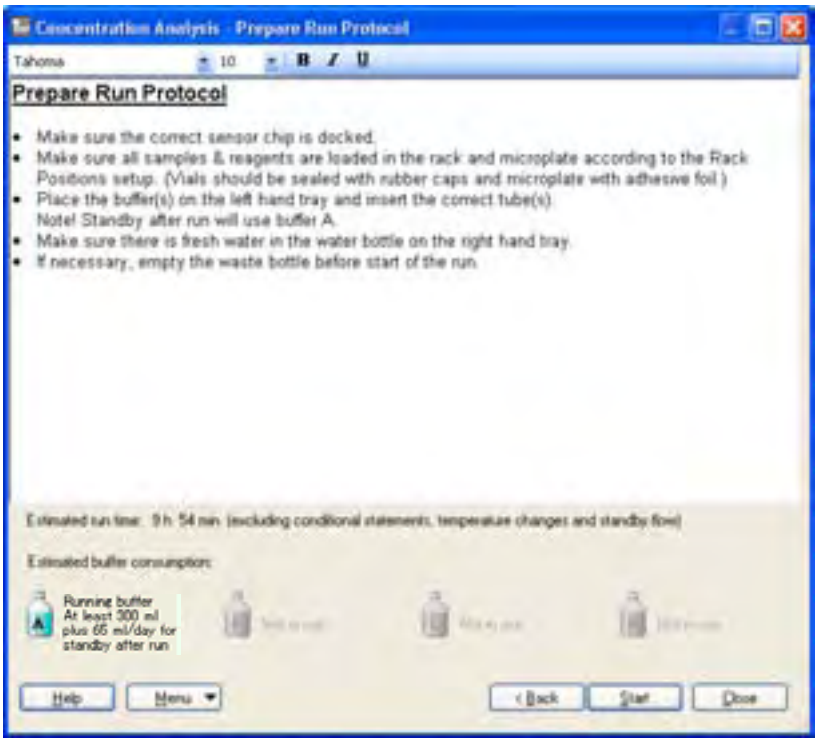
なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、OK をクリックします。
Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の Next >をクリックします。

↓


Concentration Analysis - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tube(s).
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 9 h 54 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
At least 300 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液の量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don't Save を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定がスタートします。

↓

終了後、装置は Standby flow 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

補足 3-4. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックします。

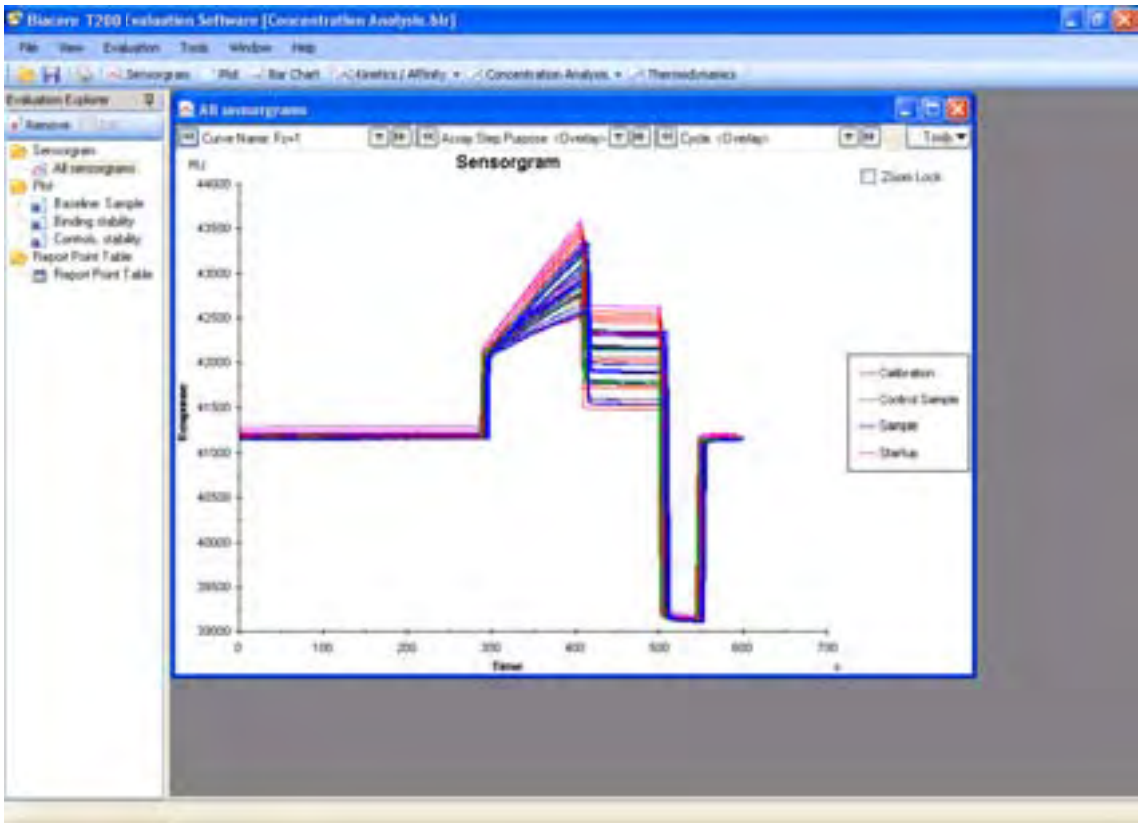
ボックス中の Stop Run をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

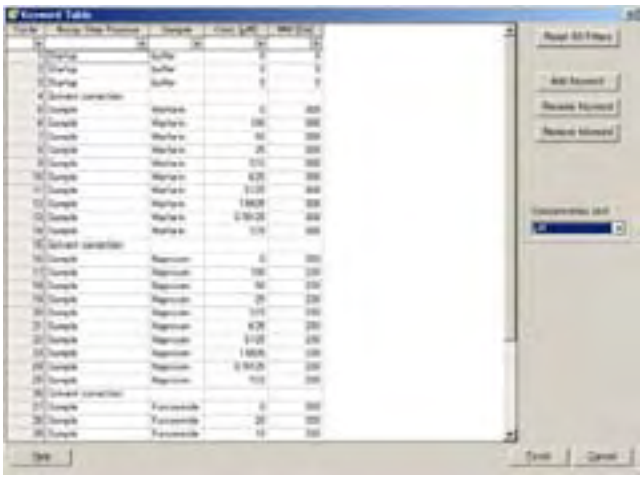
3-1-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、自動保存された取得データが開きます。

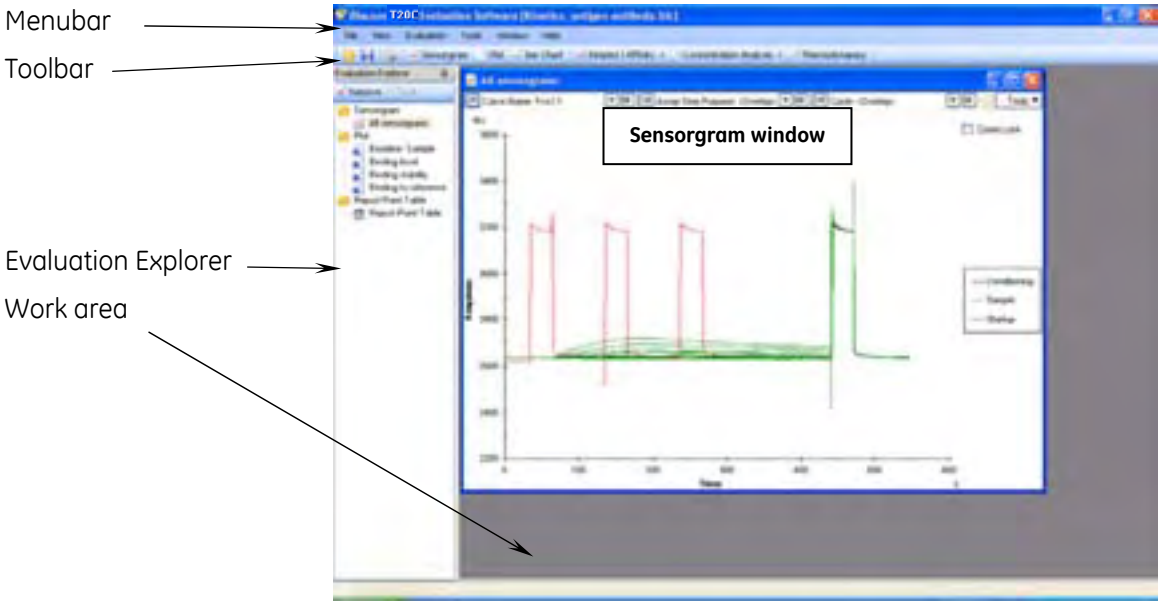


補足 3-5. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table...で変更します。Tools... → Keyword Table...をクリックします。



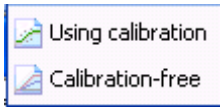
補足 3-6. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

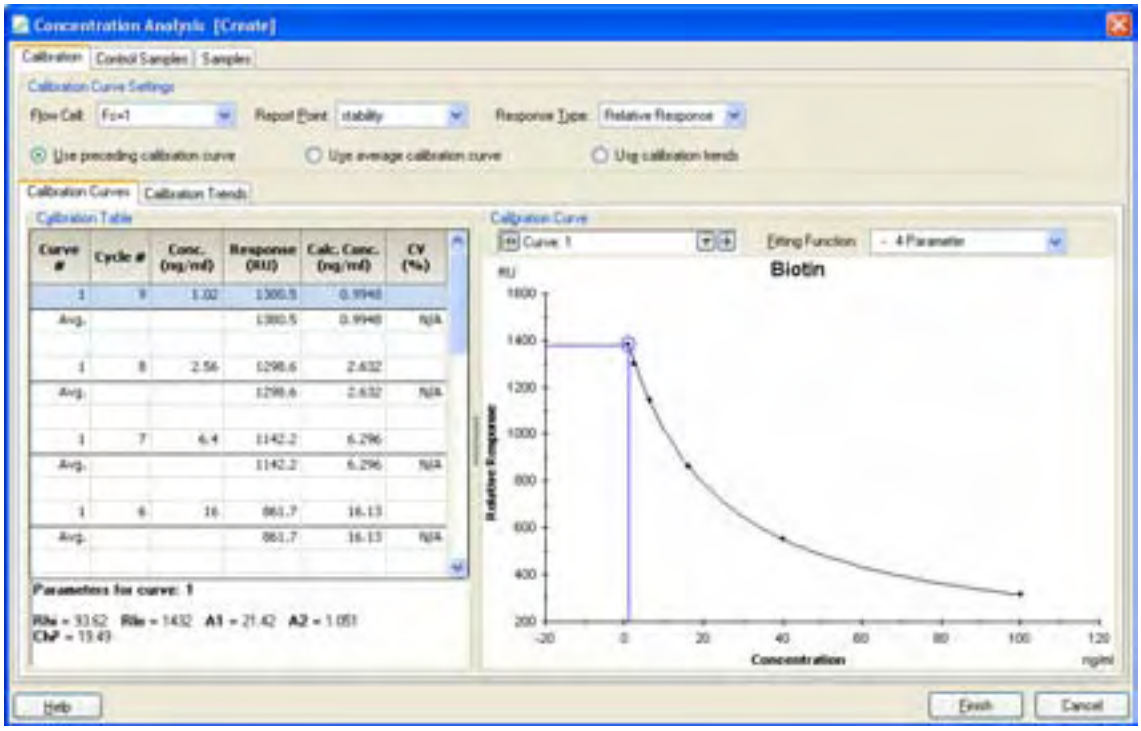
Toolbar の

をクリックします。



Using calibration をクリックします。

↓



Concentration Analysis［Create］ボックスの Calibration が表示されます。

Calibration Curve Settings

Flow cell	解析に利用するセルの選択
Report point	レポートポイントの選択
Response type	結合レスポンス（Relative Response）で濃度測定するか、傾き（Slope）で濃度測定するか選択します。
Fitting Function	検量線を linear で引くか、4-parameter で引くか選択します。
Use preceding calibration curve	サンプル測定の直前で測定した検量線を利用する場合にチェックを入れます。
Use average calibration Curve	検量線を複数作成していて平均した検量線を利用する

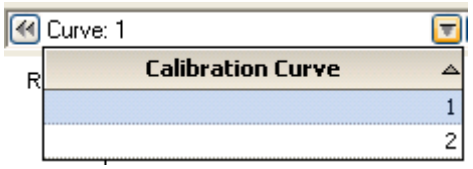
場合にチェックを入れます。

Use calibration trends　検量線を複数作成している場合で、時間経過に伴う結合量の低下を考慮したサイクル毎の検量線を利用する場合にチェックを入れます。（サイクル毎の検量線はバーチャル作成されます。）

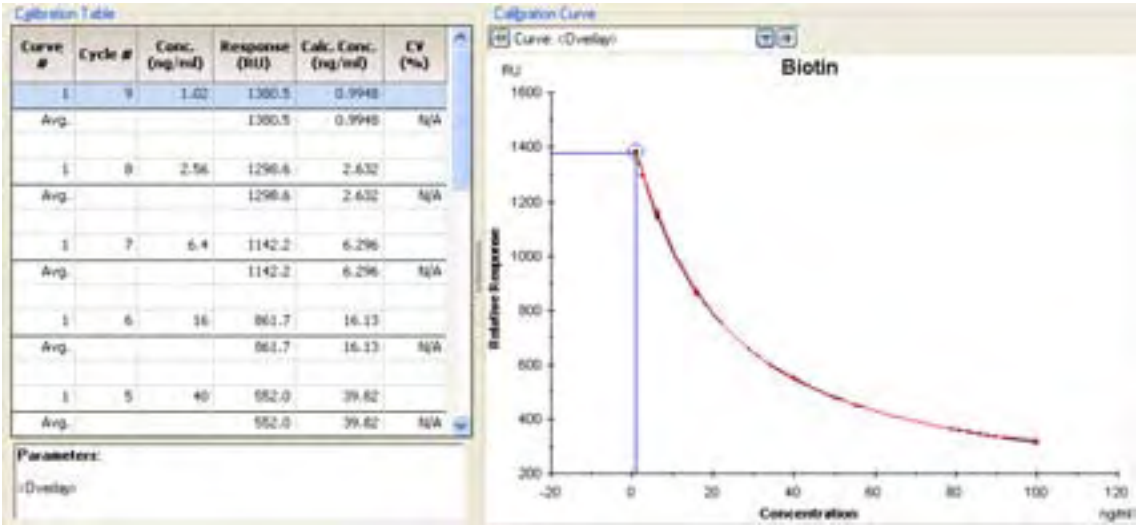
設定した条件の検量線を確認します。

Calibration Curve

の◀◀もしくは▶▶をクリックし、目的のサイクルを選択します。複数の検量線を同時に確認する場合は、▼を使用します。



キーボードの Ctrl キーを押しながら、カラム中の目的の番号をクリックします。連続した番号を選択する場合は、マウスをドラッグして選択可能です。



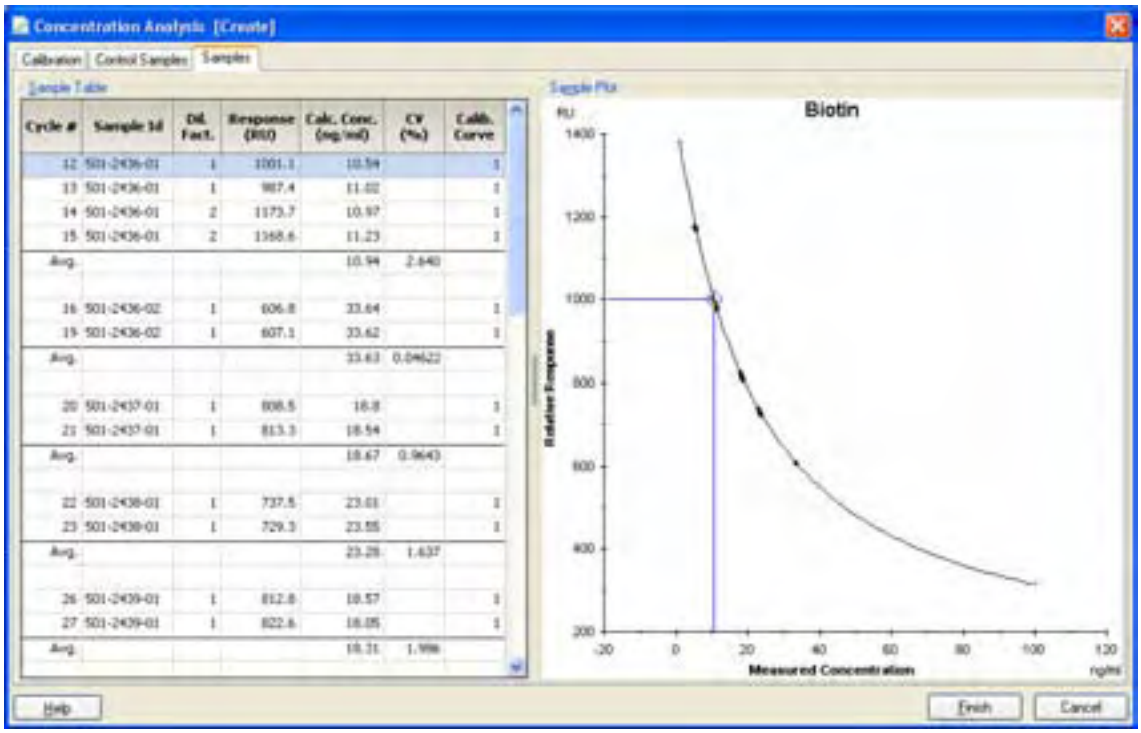
画面右に設定した検量線が表示されます。Use calibration trends を選択した場合には、全検量線の重ね書きが表示されます。

画面左の Calibration Table に検量線の各測定ポイントの詳細情報が表示されます。Conc.にはメソッドで入力した濃度、Calc.Conc.には作成した検量線から計算した濃度が表示されます。同一濃度で繰り返し測定している場合には、算出された濃度の CV 値が CV（%）に表示されます。

検量線の測定ポイントの選択削除、検量線の選択削除は、補足 3-7 および 3-8 を参照してください。

未知サンプルの測定結果

Concentration Analysis［Create］ボックス上部の Samples のタブの付いたページをクリックします。

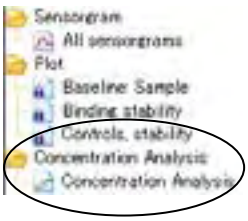


画面左の Sample Table にサンプル情報が表示されます。Dil.Fact.（希釈倍率）を掛けた濃度が Calc.Conc.に表示されます。同一サンプルで繰り返し測定している場合には、算出された濃度の CV 値が CV（%）に表示されます。
クリックして選択したサンプルについては、画面右で強調表示されます。
測定ポイントの選択削除は、補足 3-7 を参照してください。

Finish をクリックします。

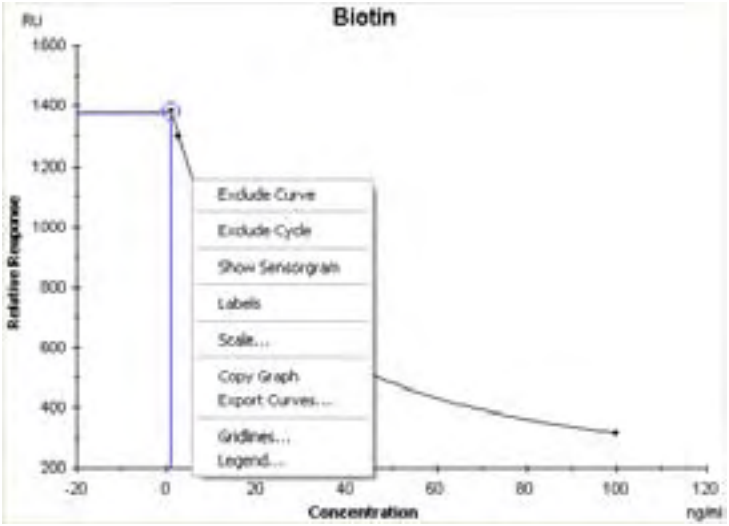
↓

解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに保存されます。



補足 3-7. 測定ポイントの削除

エアーの混入などの理由で、測定結果から削除したい測定ポイントがある場合は、その測定ポイント上にカーソルを移動し、マウスを右クリックします。



Exclude Cycle をクリックします。

↓

測定ポイントが削除され、同時に Calibration Table の削除した測定ポイントに赤色の削除ラインが引かれます。

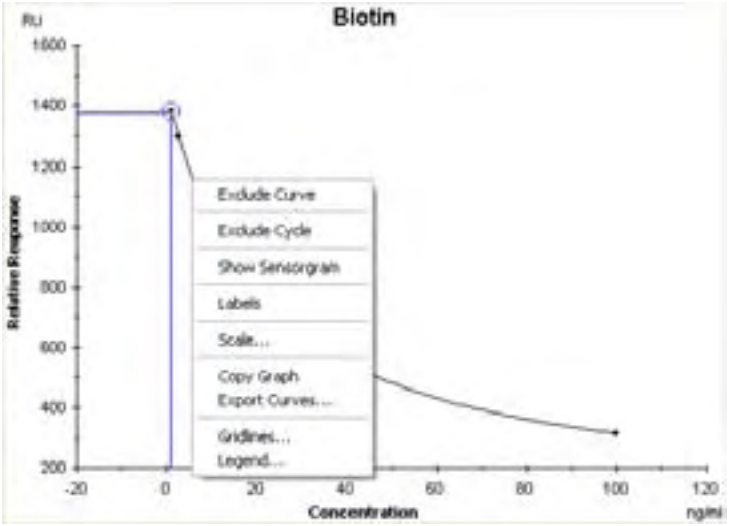
Curve #	Cycle #	Conc. (ng/ml)	Response (RU)	Calc. Conc. (ng/ml)	CV (%)
1	9	1.02	1380.5	1.017	
Avg.			1380.5	1.017	N/A
1	8	2.56	1298.6	2.565	
Avg.			1298.6	2.565	N/A
1	7	6.4	1142.2		
Avg.					
1	6	16	861.7	15.99	
Avg.			861.7	15.99	N/A
1	5	40	552.0	40.02	
Avg.			552.0	40.02	N/A

検量線の測定ポイントを削除した場合には、改めて残りの測定ポイントで検量線が作り直されます。

再度採用する場合には、マウスを右クリックして、Include Cycle を選択します。

補足 3-8. 検量線の削除

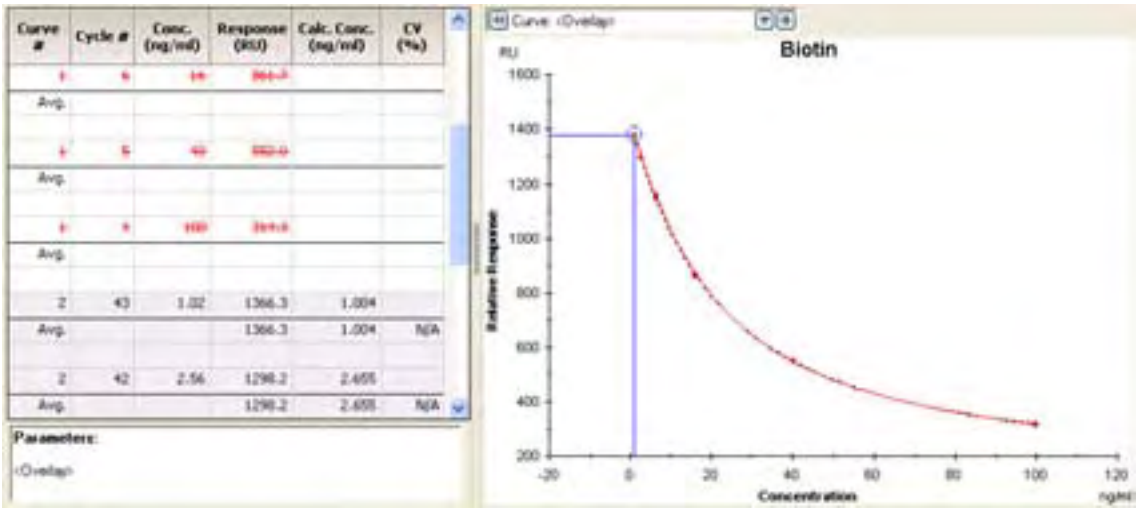
エアーの添加などの理由で、複数回数取得している検量線のうち、解析から削除したい検量線がある場合、いずれかの測定ポイント上でマウスを右クリックします。



Exclude Curve をクリックします。

↓

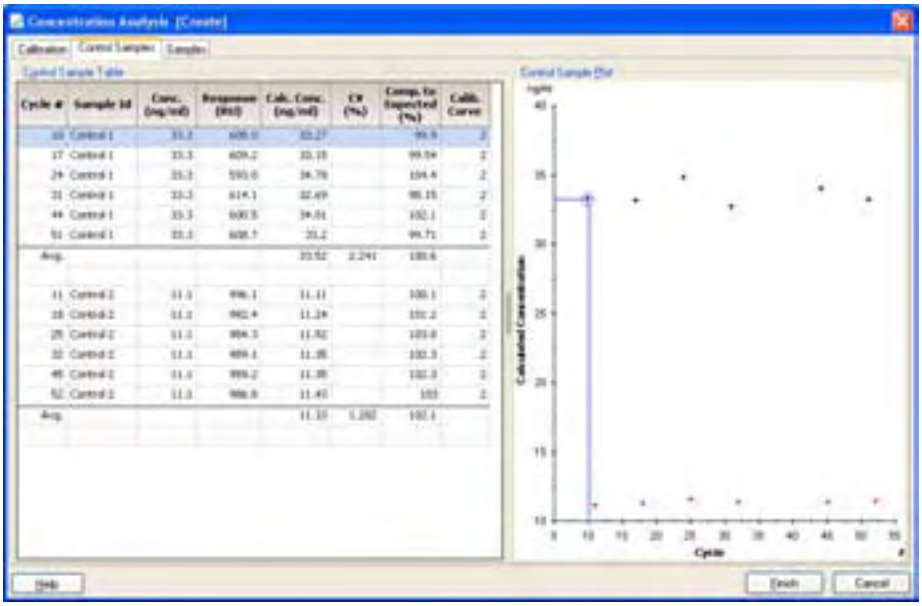
検量線は削除され、同時に Calibration Table のその検量線を構成している全測定ポイントに赤色の削除ラインが引かれます。



再度採用する場合には、マウスを右クリックして、Include Curve を選択します。

補足 3-9. コントロールサンプルのレスポンスのチェック

定期的にコントロールサンプルを添加している場合、その結合レスポンスを Concentration Analysis ［Create］ボックス上部の Control Samples のタブの付いたページでチェックすることができます。

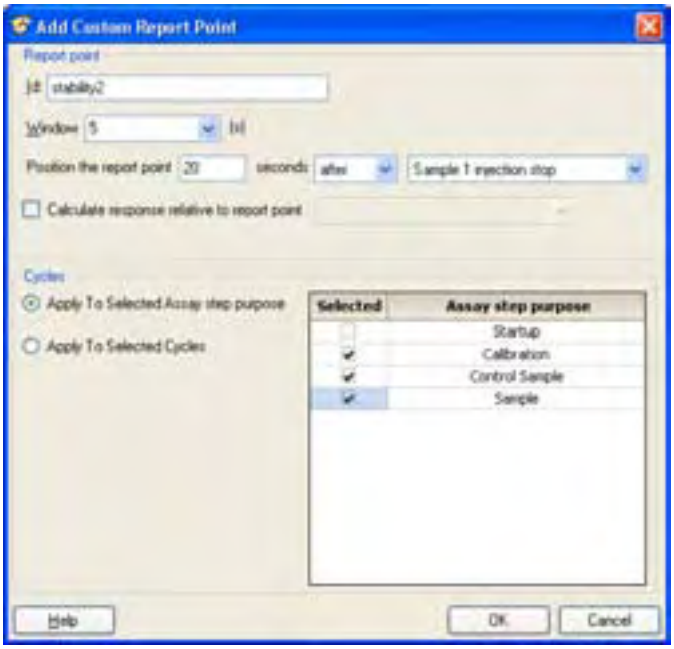


補足 3-10. レポートポイントの追加

Tools → Custom Report Points...をクリックします。

Add...をクリックします。

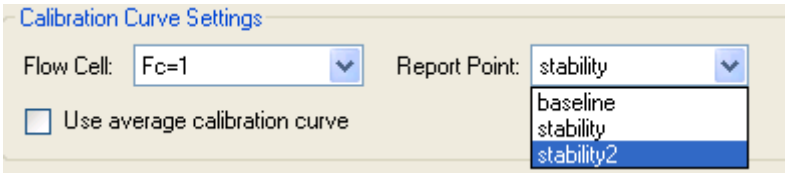
↓



Id にレポートポイントの名前を入力します。追加する位置を設定し、Cycles でどのサイクルで記録するのか設定します。
OK をクリックします。

↓

初期画面に、追加したレポートポイントが表示されます。
なお、追加したレポートポイントは、Calibaration Settings の Report Point に追加されます。



3-2. 検量線不要の濃度測定

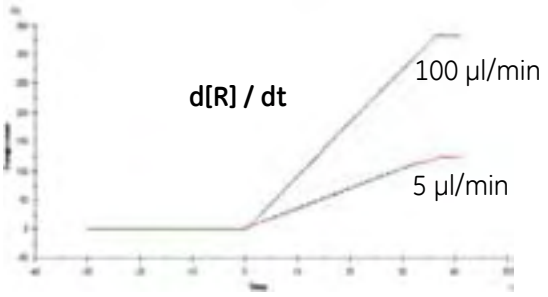
CFCA　（Calibration Free Concentration Analysis）

検量線を必要としない濃度測定法（CFCA ; Calibration Free Concentration Analysis） は、アナライトの拡散特性とセンサーグラムの結合領域初期における結合速度（初期結合速度）を利用して、カーブフィッティングにより、結合活性を有するアナライト分子の絶対濃度を算出する方法です。適した標準分子がない場合や、標準サンプルの結合活性濃度を確認したい場合に有効です。さらに、厳密な速度定数と親和定数を求める目的においても、CFCA により絶対的な結合活性濃度を求めることは有効です。

$$\frac{d[R]}{dt} = f\ （M_w, k_m, Conc）$$

M_W ：分子量（Da）

k_m ：マストランスポート係数



CFCA では、リガンドをできるだけ多く固定化（例：分子量 150 kDa で 5000 RU 以上）し、マストランスポートリミテーション条件下で測定を実施します。固定化量が多い表面において、初期結合速度は、アナライトの分子量（Mw）、マストランスポート係数（km）、アナライト濃度（Conc）で決定されます。このため、上記の初期結合速度（d[R] / dt）の関数を利用してサンプル中のアナライト濃度を算出することができます。

測定は、アナライトを最低 2 流速（5 および 100 µl/min を推奨）で添加して、センサーグラムから初期結合速度を求めます。マストランスポート係数（km）は、拡散係数（D）、流速、フローセル容積から計算できます。得られた 2 流速でのセンサーグラムを、1:1 結合モデルで Kinetics 解析し、アナライトの分子量（Mw）、km 値を定数とし、アナライト濃度をパラメータとしてカーブフィッティングすることで濃度を算出します。なお、アナライトが抗体（Bivalent Analyte）であっても、マストランスポートリミテーション条件下で、カーブフィッティングが良好であれば、CFCA を実施することができます。

参考文献：

Christensen, Anal. Biochemistry （1997） 249, p.153

Sigmundsson, K., *et. Al.,* Biochemistry （2002） 41, p.8263

CFCA を実施するための至適条件

① アナライト	分子量　≧ 5,000 Da
② 結合速度定数（k_a）	$10^7 > k_a > 5 \times 10^4\ M^{-1}s^{-1}$
③ 固定化量	できるだけ多く固定化します。 （分子量 150 kDa では、5,000 RU 以上は必要。）
④ アナライト濃度	CFCA で良好な結果が得られる濃度レンジは、0.05～5 µg/ml です。測定に用いるサンプル濃度は、1 µg/ml 程度が至適です。吸光度（280 nm）による総タンパク質濃度を基準として調製します。濃度が不明な場合には、10 倍希釈系列で 4 濃度以上調製してください。
⑤ 流速	5 µl/min および 100 µl/min を推奨します。
⑥ サンプルの性状	拡散係数や分子量が大きく異なる分子の混合溶液の場合には CFCA は実施できません。 例）アナライトが IgG のポリクローナル抗体の場合には CFCA は可能ですが、アナライトが IgG と IgM の混合溶液の場合には CFCA は実施できません。
⑦ リファレンスセル	リファレンスセルも設定し、リファレンスセルを差し引いたセンサーグラムを利用して CFCA を実施します。
⑧ 非特異的吸着	非特異的吸着が起きている場合に正確な濃度が算出できません。

補足 3-11. マストランスポート、マストランスポートリミテーションとは

マストランスポートとは、フローセルを流れる溶液中からセンサーチップ表面への、アナライトの拡散現象を表します。アナライトのセンサーチップ表面への拡散（供給）速度は、次式で求められます。

アナライトの拡散速度（mol/m²s）＝アナライト濃度 × マストランスポート係数（km）

$$k_m = 0.98 \times \sqrt[3]{\frac{D^2 \times f}{0.3 \times h^2 \times w \times l}}$$

D　：拡散係数　　f　：測定流速　　h：フローセルの高さ
w　：フローセルの幅　　l　：フローセルの長さ

なお、アナライトの拡散速度よりも、センサーチップ表面のリガンドとの結合速度が速い場合、マストランスポートが結合速度を制限するため、マストランスポートリミテーションが起きているといえます。リガンドの固定化量が多い場合には、マストランスポートリミテーションが起こりやすいです。

補足 3-12. 拡散係数の求め方

CFCA を実施する場合、20℃における拡散係数がパラメータとして必要です。
拡散係数は、分子のサイズと形状によって決定され、次式によって算出できます。

$$D = \frac{324.3\times10^{-11}}{f\times\eta_{rel}\times M_w^{1/3}} \quad (m^2/s)$$

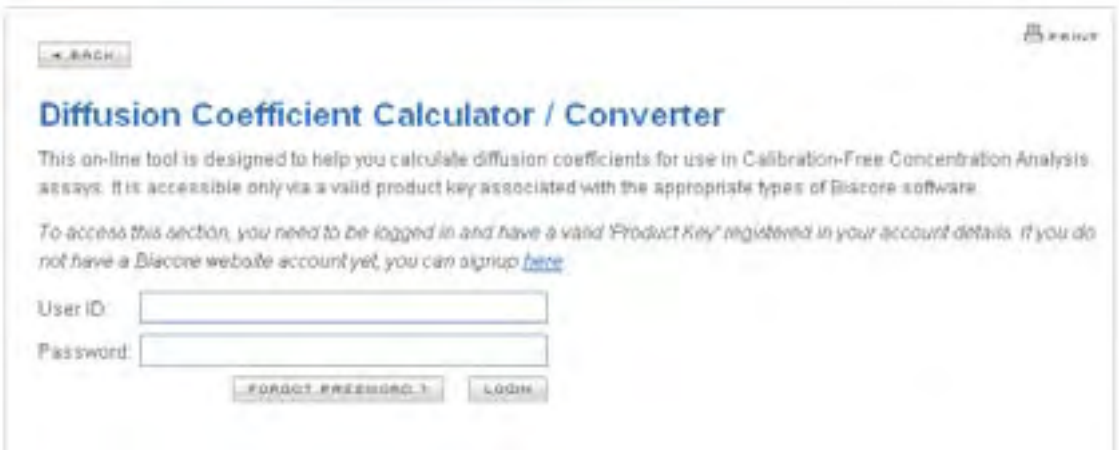
f　　：摩擦率
η_{rel}　：20℃での水に対するアナライト溶媒の粘性
Mw　　：分子量（Da）

なお、以下の方法でも拡散係数を得ることができます。
① 弊社 Web サイト上の Biacore T200 拡散係数算出ツール
② 文献値
③ 実験的に算出（超遠心分析や光散乱分析など）

弊社 Web サイトの Biacore T200 拡散係数算出ツールによる拡散係数の求め方

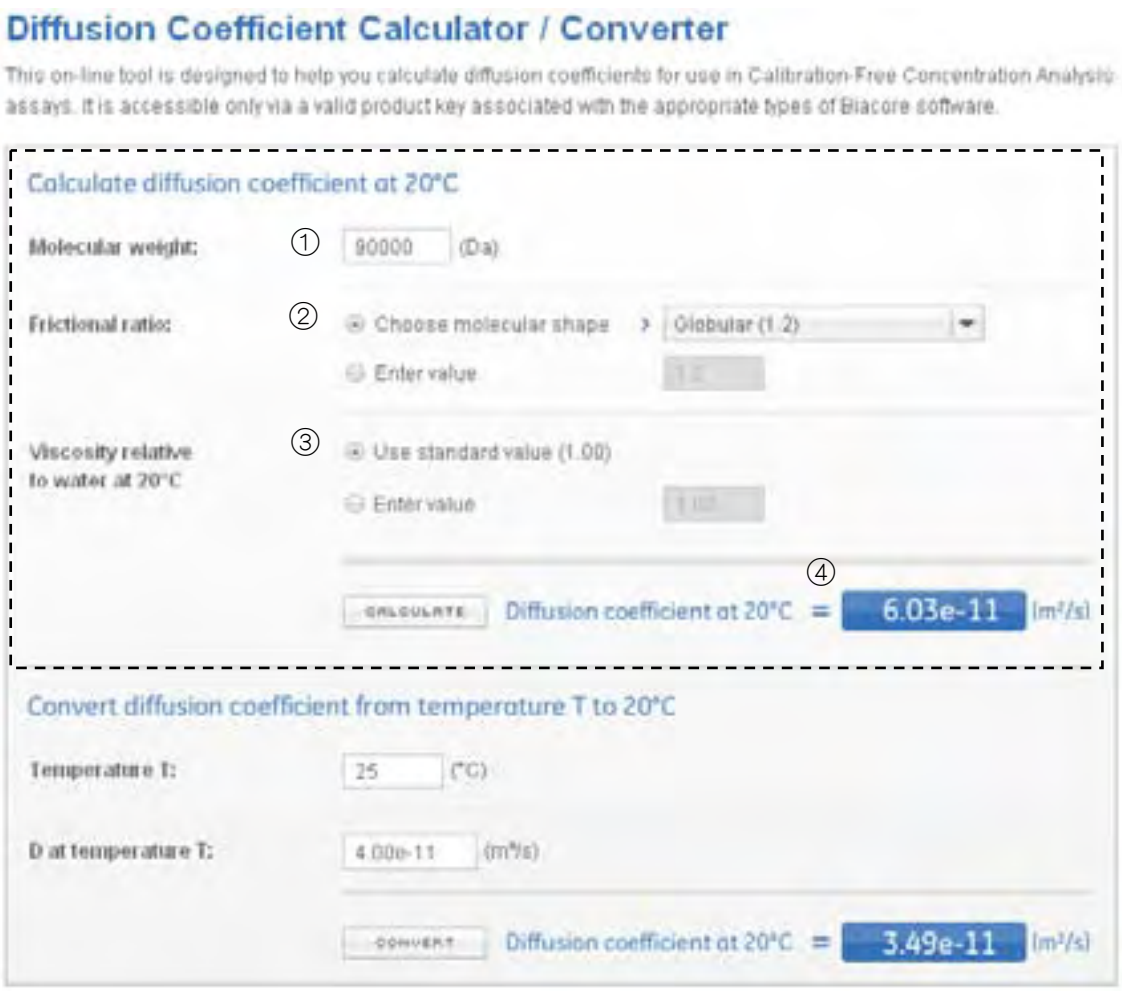
次のアドレスにアクセスします。
http://www.biacore.com /diffusion_calculator

↓


Diffusion Coefficient Calculator / Converter
This on-line tool is designed to help you calculate diffusion coefficients for use in Calibration-Free Concentration Analysis assays. It is accessible only via a valid product key associated with the appropriate types of Biacore software.
To access this section, you need to be logged in and have a valid 'Product Key' registered in your account details. If you do not have a Biacore website account yet, you can signup here
User ID:
Password:
LOGIN

ユーザー名（User ID）とパスワード（Password）を入力して、LOGIN をクリックします。（事前に、ユーザー登録が必要です。）

↓

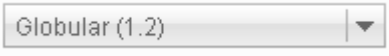


画面上で、20℃における拡散係数を算出します。

① Molecular weight:　分子量（Da）を入力します。

② Friction ratio:　摩擦率。

〇Choose molecular shape にチェックを入れ、



の▼をクリックして該当の値を選択します。以下の、3 項目から選択できます。

- Globular　（1.2）・・・球形のタンパク質（初期設定値）
  例）抗体など
- Moderately elongated　（1.7）・・・長いタンパク質
  例）フィブロネクチンやプラスミノーゲンなど
- Elongated　（2.5）・・・硬く、長いタンパク質
  例）フィブリノーゲンやトロポミオシンなど

○ Enter value にチェックを入れると、任意の値を入力できます。

③ Viscosity relative to water at 20℃

20℃における水に対するアナライト溶媒の粘性。○ Use standard value （1.00）にチェックを入れると、粘性係数を 1 とします。（初期設定値）

○ Enter value にチェックを入れると、任意の値を入力できます。

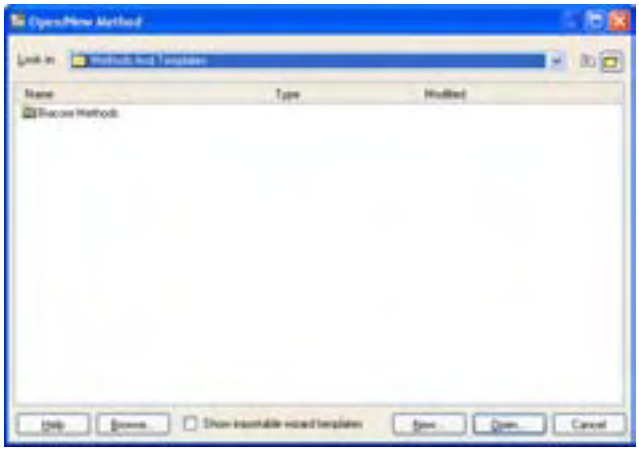
①～③の設定が終了したら、 CALCULATE をクリックし計算を実行します。④に計算結果が表示されます。

画面下では、任意の温度における拡散係数から、20℃における拡散係数を算出することができます。文献や実測によって、20℃以外での拡散係数が得られている場合にも利用できます。

3-2-1. プログラムの実行

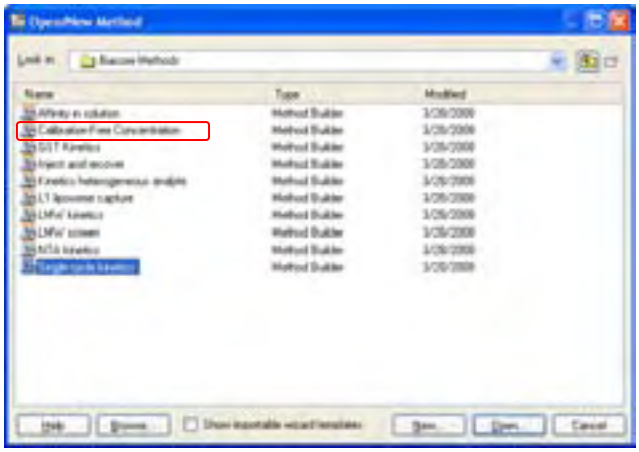
Toolbar の Run Method アイコン（ ）または Menu bar の Run → Method...をクリックします。

↓



Biacore Methods を選択した後、Open...をクリックします。

↓



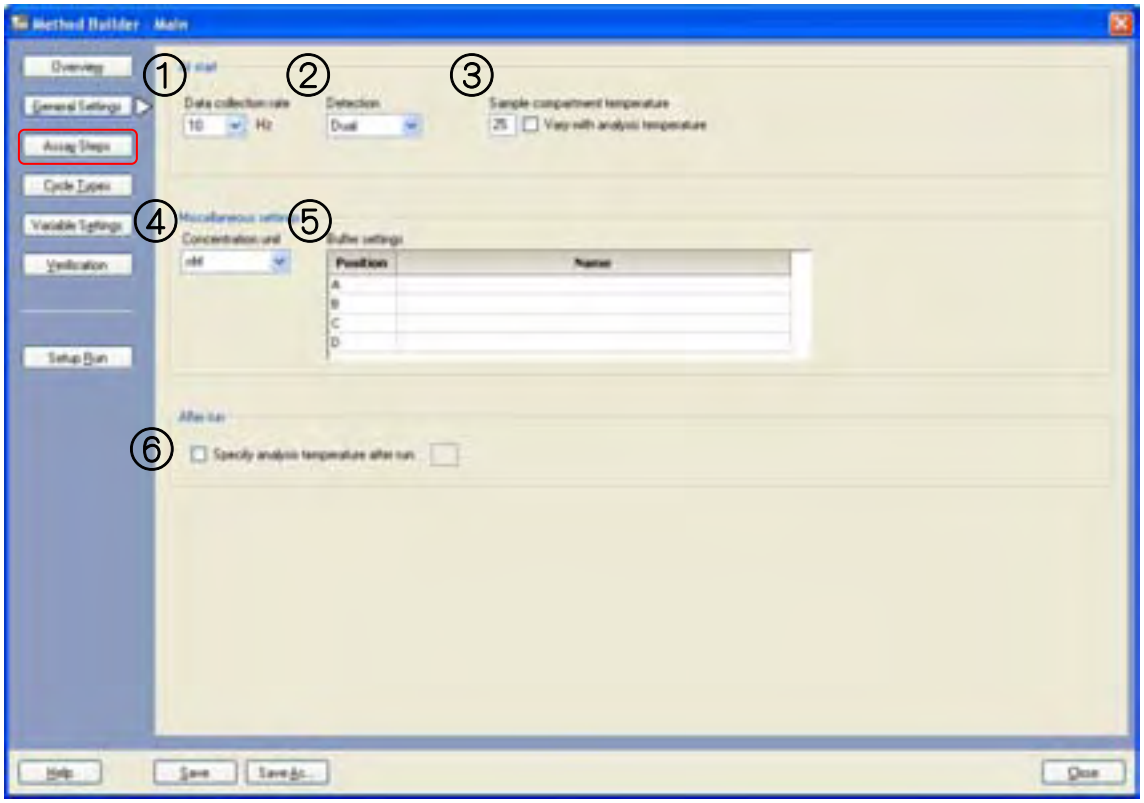
Calibration-Free Concentration を選択した後、Open...をクリックします。

↓

Method Builder の Main ダイアログが表示されます。Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示されます。以下に変更項目について記載します。詳細は Biacore T200 日本語取扱説明書 -基本操作編-を参照してください。

↓

General Settings をクリックします。



① Data Collection rate

10 Hz を選択します。

② Detection

検出モードを以下の 2 つ（Dual, Multi）から選択します。

Dual　2-1、4-3

Multi　2-1,4-3、2-1,3-1,4-1

③ Sample compartment temperature

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定します。通常は、25℃。

④ Concentration unit

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択します。

⑤ Buffer settings

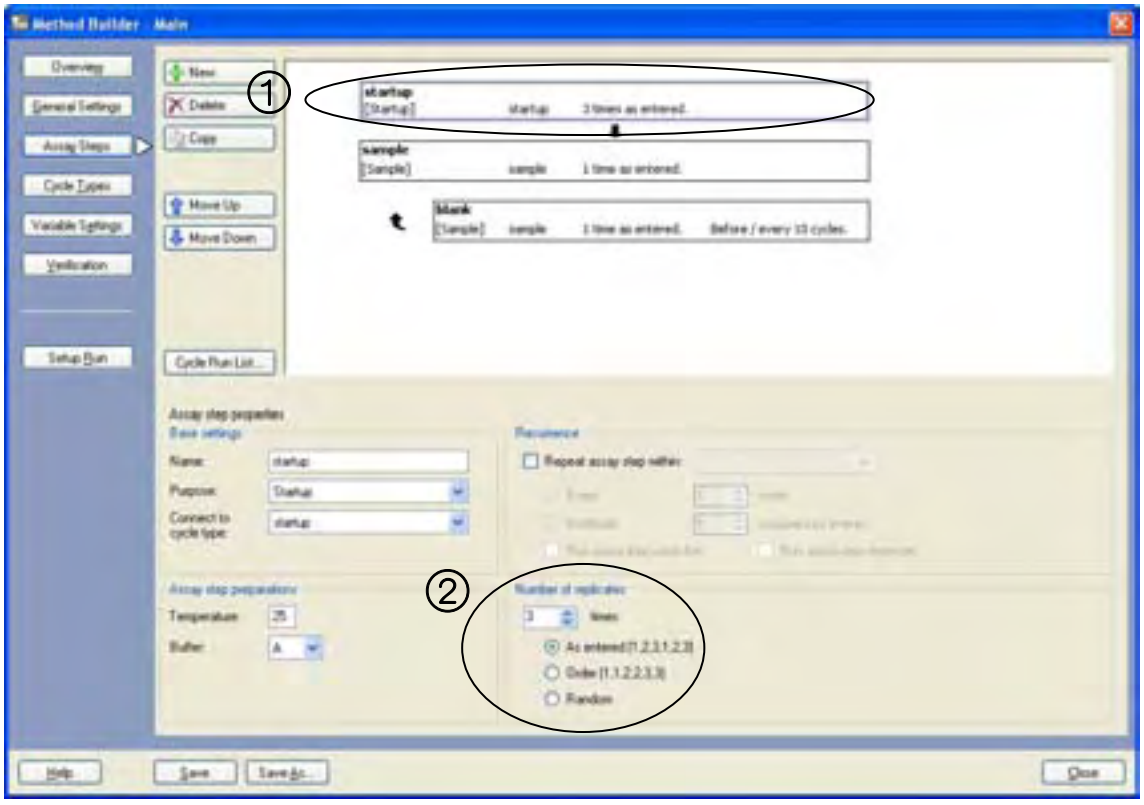
使用するランニング緩衝液名を入力します。

⑥ After run

チェックを入れておくと、全測定が終了した後に、センサー表面の温度が指定した温度に自動変更されます。

設定後、Assay Steps をクリックします。

↓



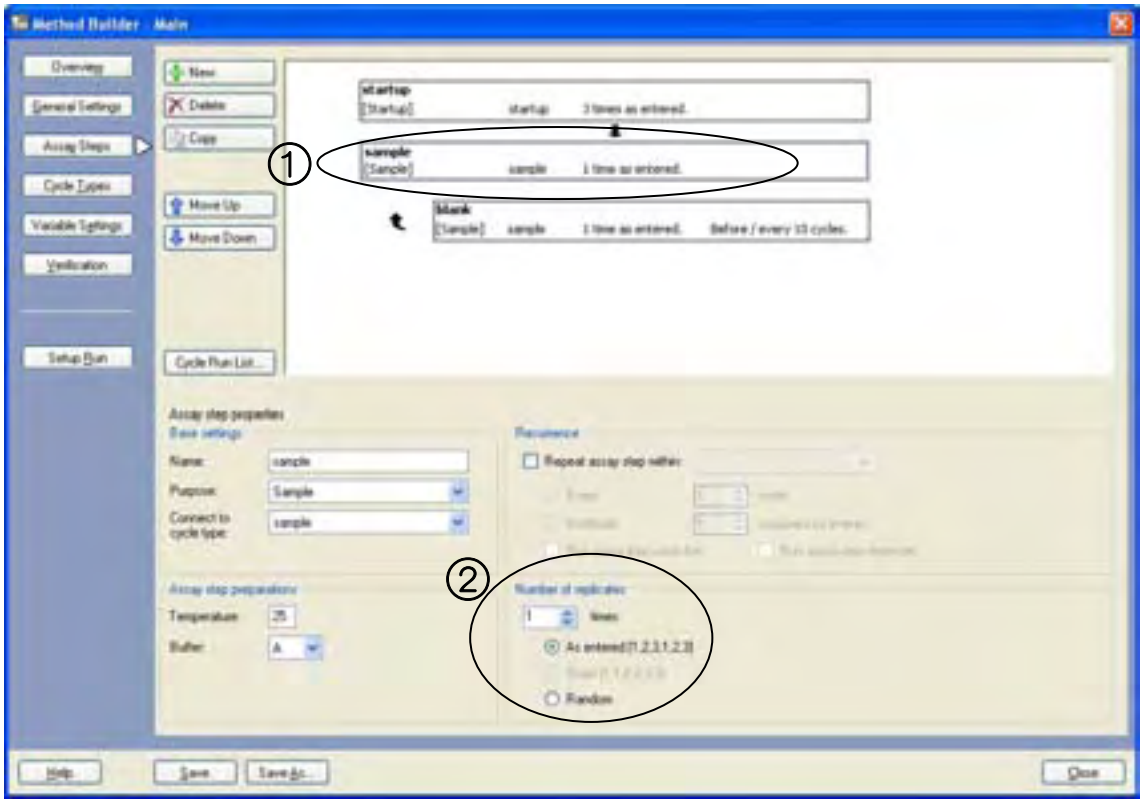
① Startup を選択します。

② 下記のように設定します。

Number of replicates

times　　ベースライン安定化のためのスタートアップの測定回数を指定します。3 回以上を推奨します。

↓



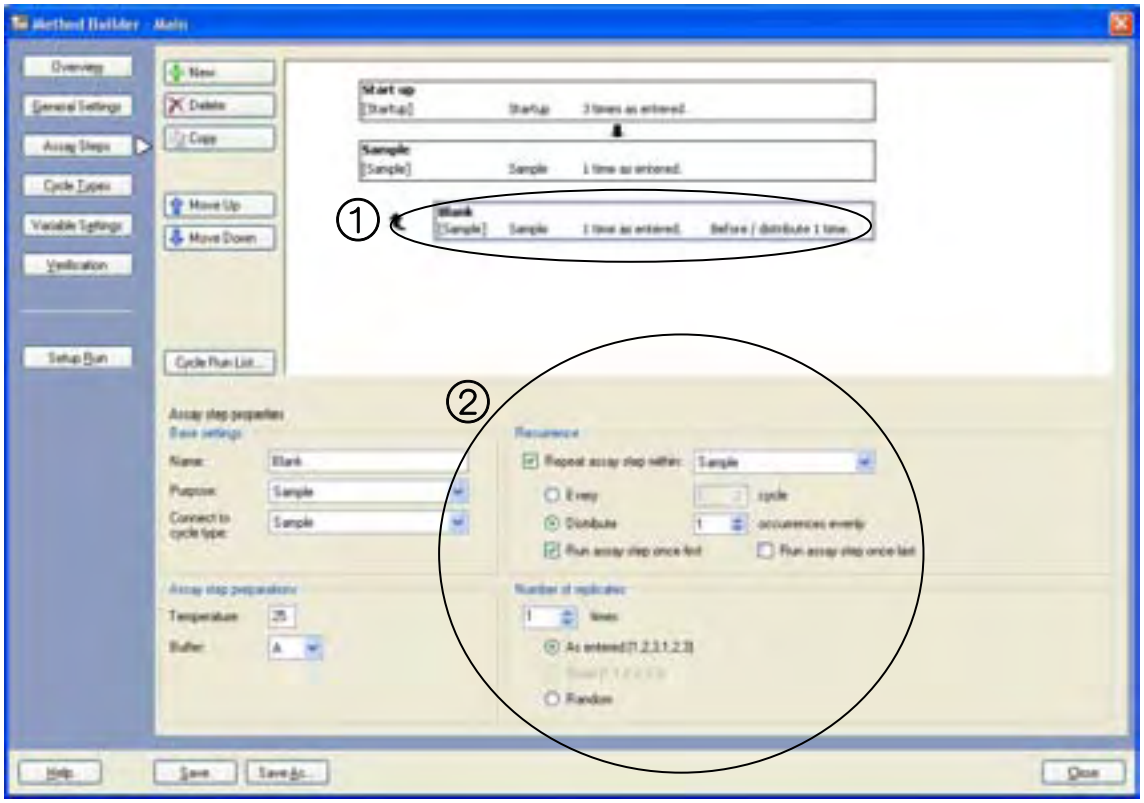
① Sample を選択します。

② 下記のように設定します。

Number of replicates

times　　繰り返し測定回数を選択します。

↓



① Blank を選択します。

② 下記のように設定します。

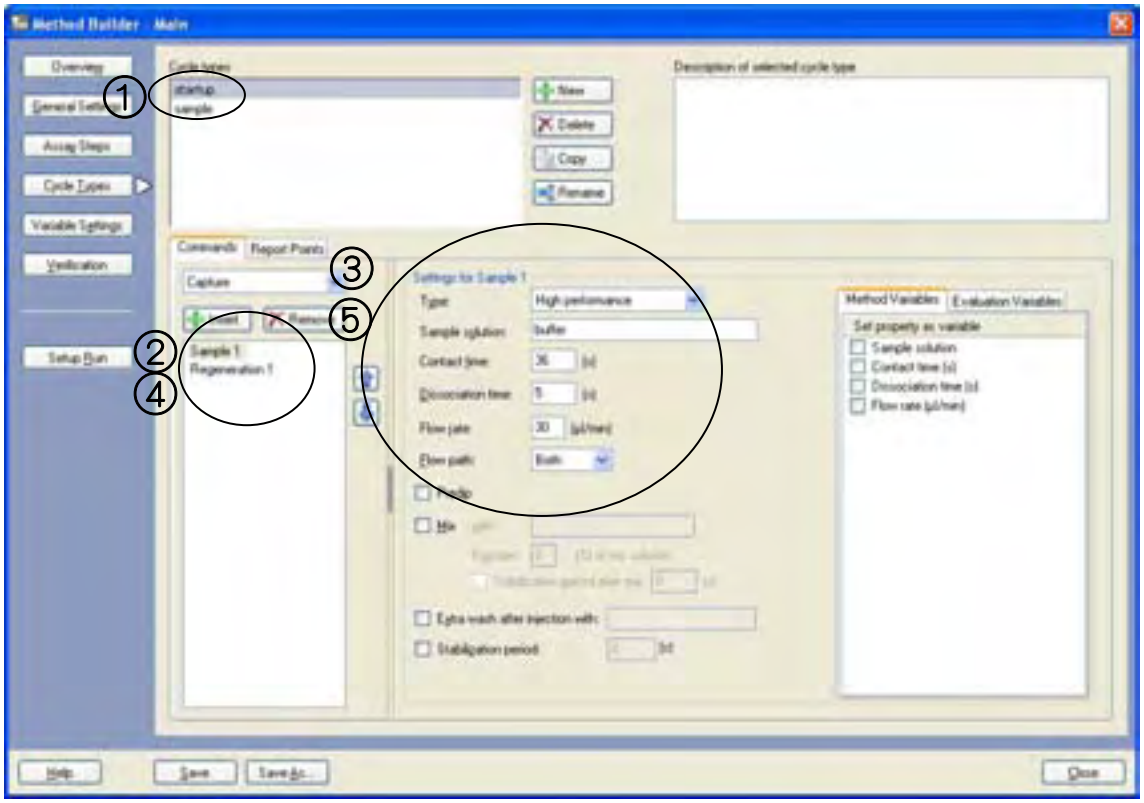
Recurrence　　〇Distribute にチェックを入れ、occurrences evenly で 1 を選択。
全測定サイクル内で、均等にブランクの測定を実施します。

Number of replicates

times　　繰り返し測定回数を選択します。

↓

Cycle Types をクリックします。



① Startup をクリックします。アナライト測定前のスタートアップの詳細を設定します。

② Commands タブの Sample1 をクリックします。

③ Settings for Sample1 でスタートアップ用サンプル（Buffer）添加の詳細条件を設定します。測定流速以外は、サンプル添加と同一条件を設定します。

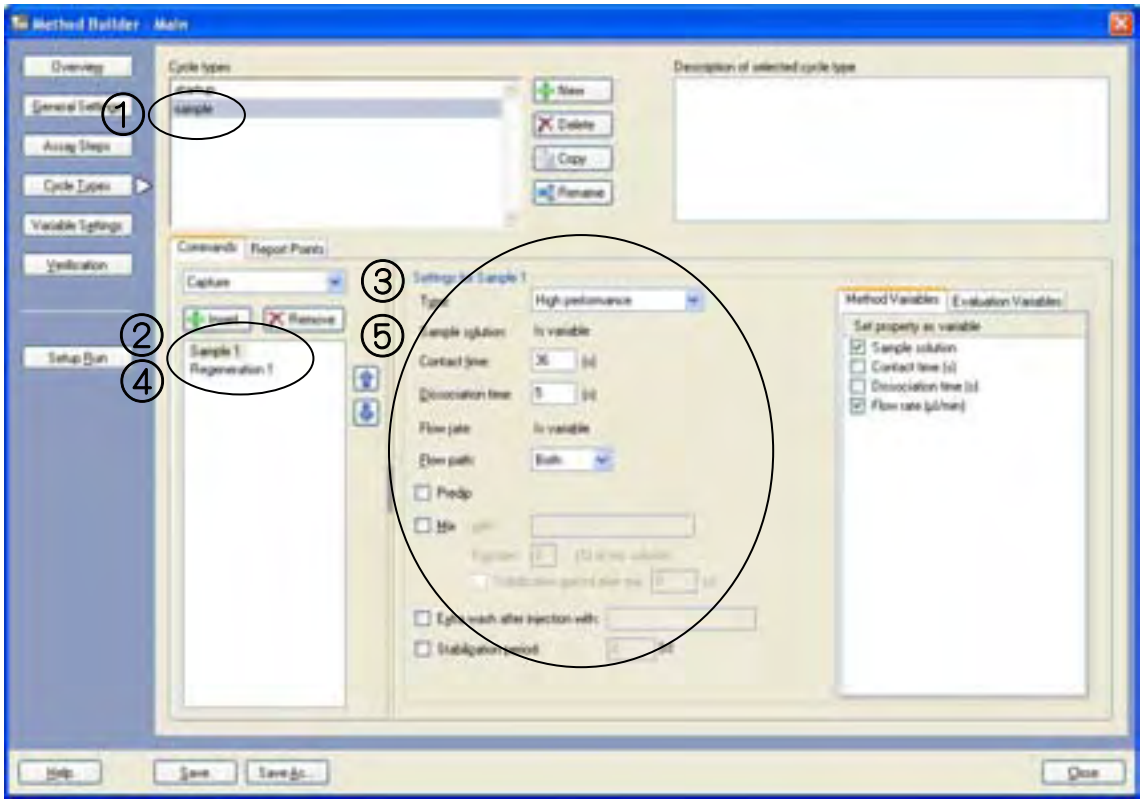
Type	High performance を選択します。
Contact time	添加時間（s）。基本は 36 秒です。
Dissociation time	解離時間（s）。基本は 5 秒です。
Flow rate	流速（µl/min）。基本は 30µl/min です。
Flow path	Both を選択します。
Sample solution	Buffer （ランニング緩衝液）

④ 引き続き、Commands タブの Regeneration1 をクリックします。

⑤ 再生条件を設定します。

Regeneration solution	再生溶液名を入力します。
Contact time	添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Flow path	Both を選択します。

↓



① Cycle types currently in Method の Sample をクリックします。

② Commands タブの Sample 1 をクリックします。

③ Settings for Sample1 でサンプル添加の詳細条件を設定します。

Type	High performance を選択します。
contact time	添加時間（s）。基本は 36 秒です。
Dissociation time	解離時間（s）。基本は 5 秒です。
Flow rate	Is variable に設定されています。実数は、Setup Run の Variables で入力します。
Flow path	Both を選択します。

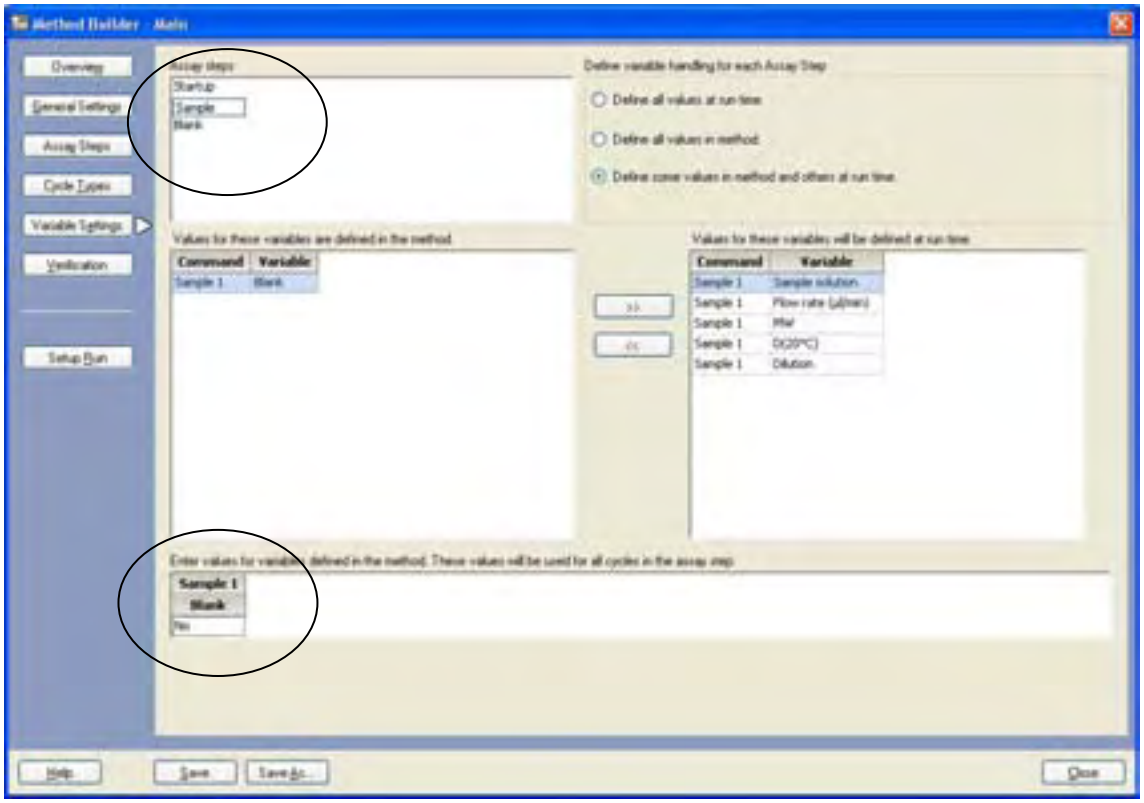
④ 引き続き、Commands タブの Regeneration 1 をクリックします。

⑤ 再生条件を設定します。

Regeneration solution	再生溶液名を入力します。
contact time	添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Flow path	Both を選択します。

↓

Variable Settings を選択します。



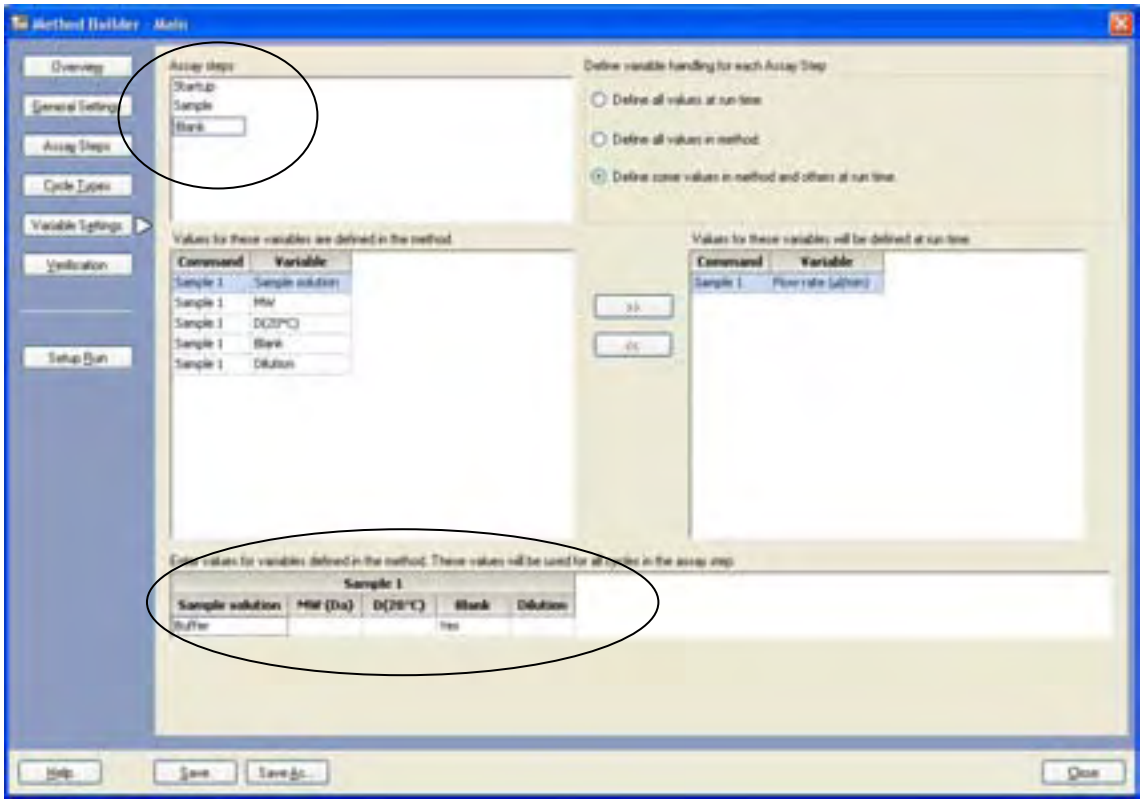
Assay Steps の Sample をクリックします。画面右上で、○ Define some values in method and others at run time. にチェックを入れます。下記の 5 項目については、Setup Run 以降の Variables で入力します。

Sample solution	サンプル名
Flow rate （µl/min）	同一サンプルで、5 µl/min と 100 µl/min の 2 流速を設定します。
MW（Da）	分子量
D（20℃）	20℃における拡散係数
Dilution	サンプルの希釈倍率

以下について、画面下で設定します。

Blank	解析時のキーワードとして利用します。ブランクサンプルか否かを指定します。サンプルの場合には、"No"または"n"を入力します。

↓



Assay Steps の Blank をクリックします。画面右上で、○ Define some values in Method and others at run time. にチェックを入れます。Flow rate （µl/min）については、Setup Run 以降で入力します。

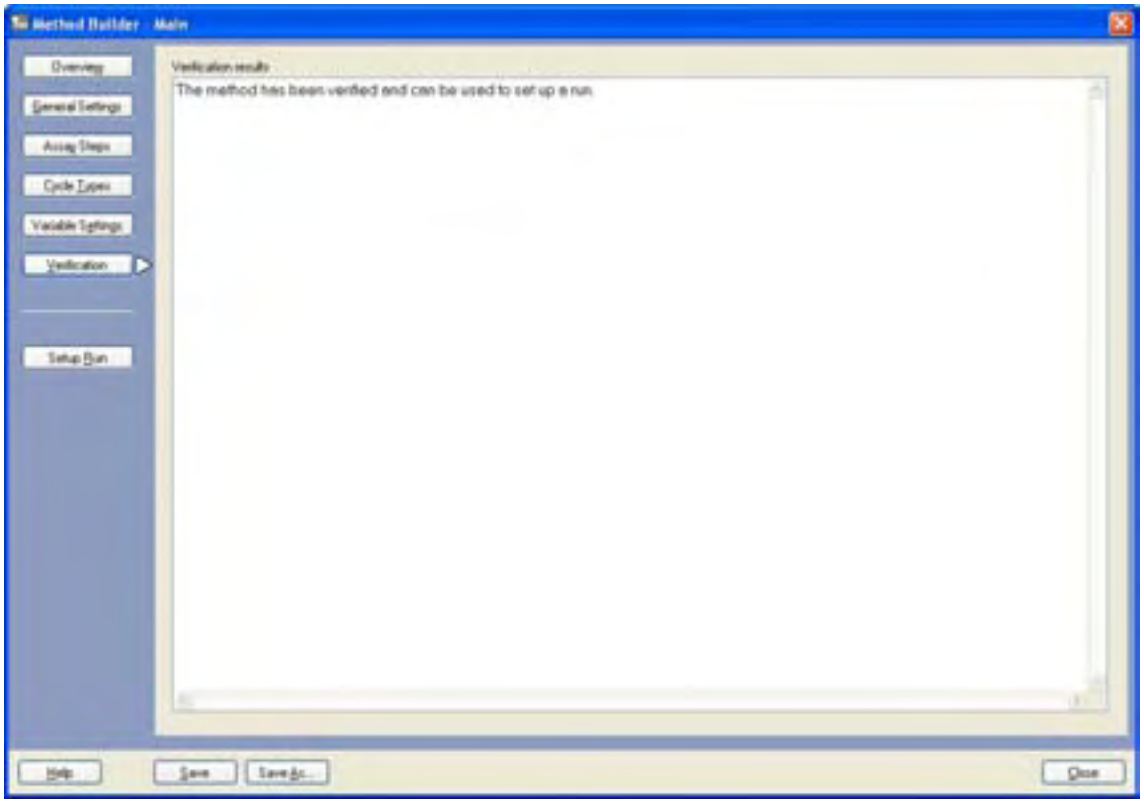
画面下で、下記の項目について入力します。

Sample solution	“Buffer”と入力します。
MW（Da）	未入力
D（20℃）	未入力
Blank	ブランクサンプルの場合には、”Yes”または“y”を入力します。
Dilution	未入力

↓

Verification をクリックします。

↓

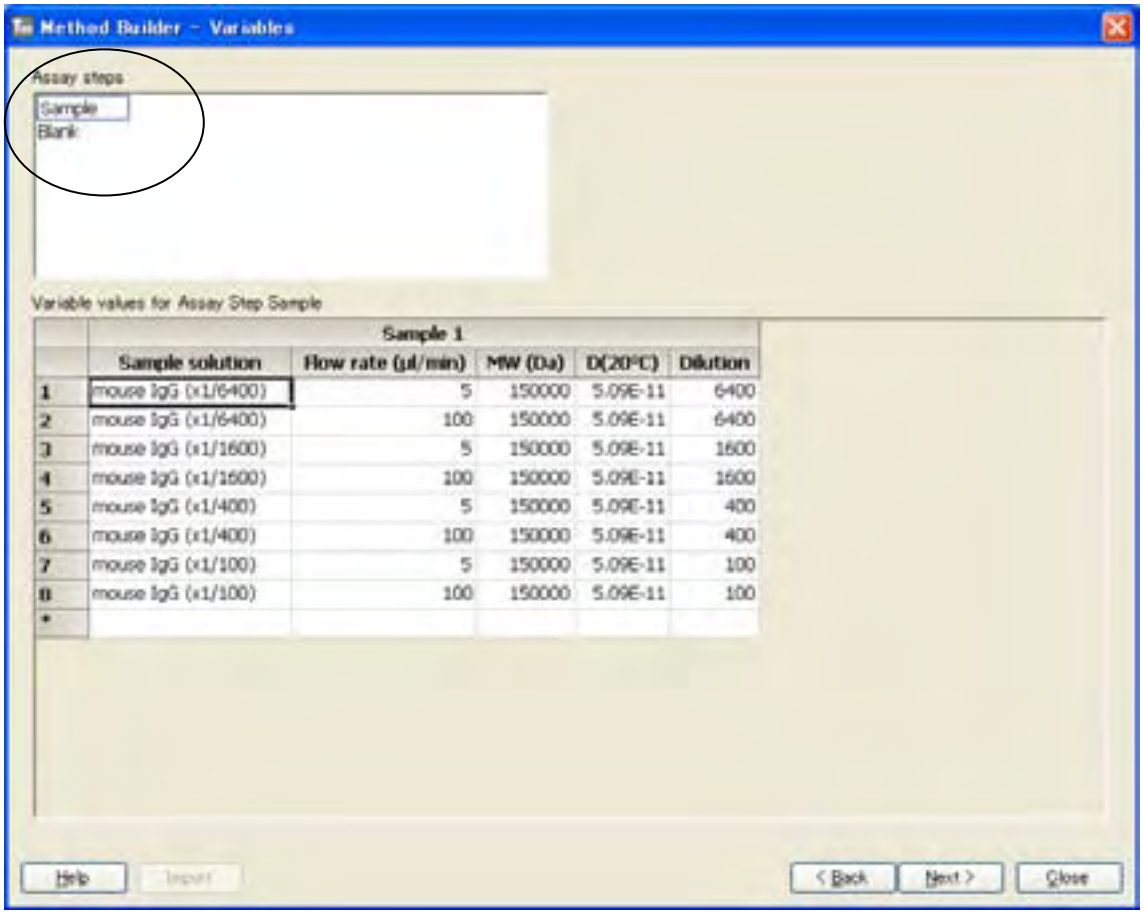


メソッドの設定に不備が無ければ“The Method has been verified and can be used to set up a run.”と表示されます。問題が有る場合は該当部分が表示されるので、指示に従って修正します。確認後、Setup Run をクリックします。

↓

適切な Flow path を選択し、Next >をクリックします。

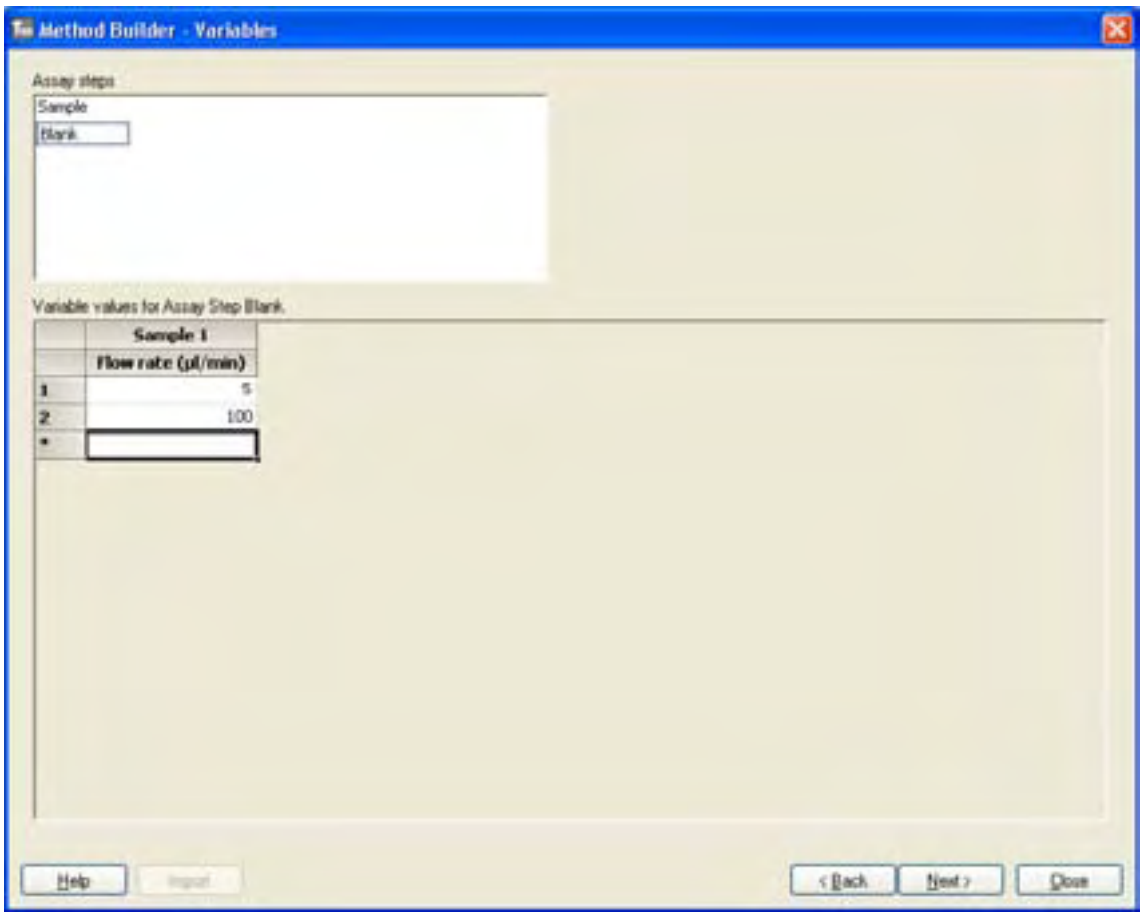
↓


Method Builder - Variables
Assay steps
Sample
Blank
Variable values for Assay Step Sample
Sample 1
Sample solution | Flow rate (µl/min) | MW (Da) | D(20°C) | Dilution
1 mouse IgG (x1/6400) 5 150000 5.09E-11 6400
2 mouse IgG (x1/6400) 100 150000 5.09E-11 6400
3 mouse IgG (x1/1600) 5 150000 5.09E-11 1600
4 mouse IgG (x1/1600) 100 150000 5.09E-11 1600
5 mouse IgG (x1/400) 5 150000 5.09E-11 400
6 mouse IgG (x1/400) 100 150000 5.09E-11 400
7 mouse IgG (x1/100) 5 150000 5.09E-11 100
8 mouse IgG (x1/100) 100 150000 5.09E-11 100
Help
Import
< Back
Next >
Close

Sample をクリックします。下記項目について入力します。

Sample solution	サンプル名
Flow rate　(µl/min)	同一サンプルで、5 µl/min と 100 µl/min の 2 流速を設定します
Mw（Da）	分子量
D（20℃）	20℃における拡散係数
Dilution	サンプルの希釈倍率

↓



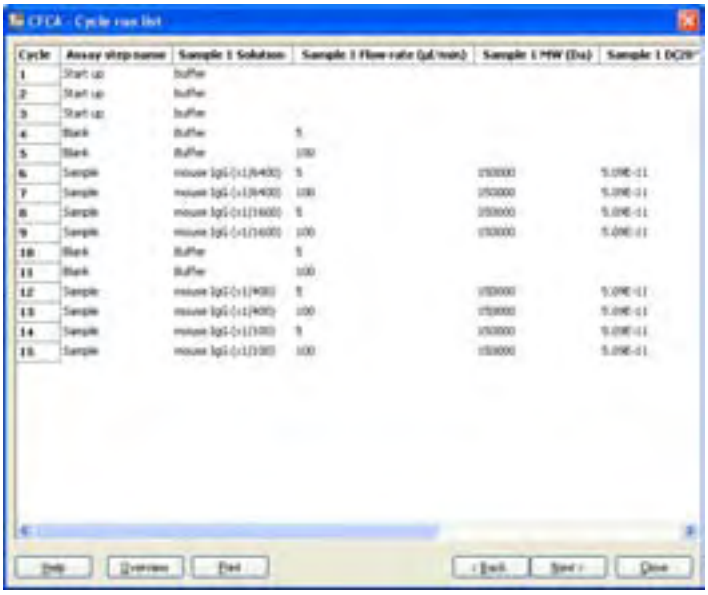
引き続き、Blank をクリックします。

Flow rate　(µl/min)　　Sample と同一の流速を設定します

設定後、Next >をクリックします。

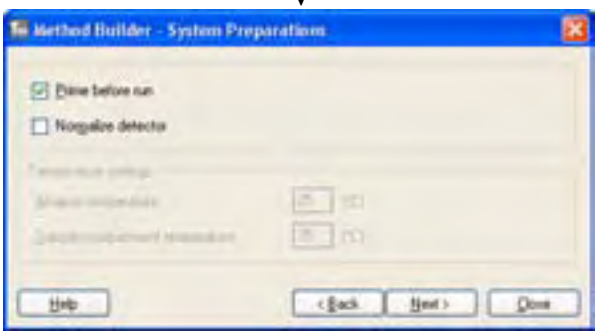
↓

測定サイクルリストが表示されます。



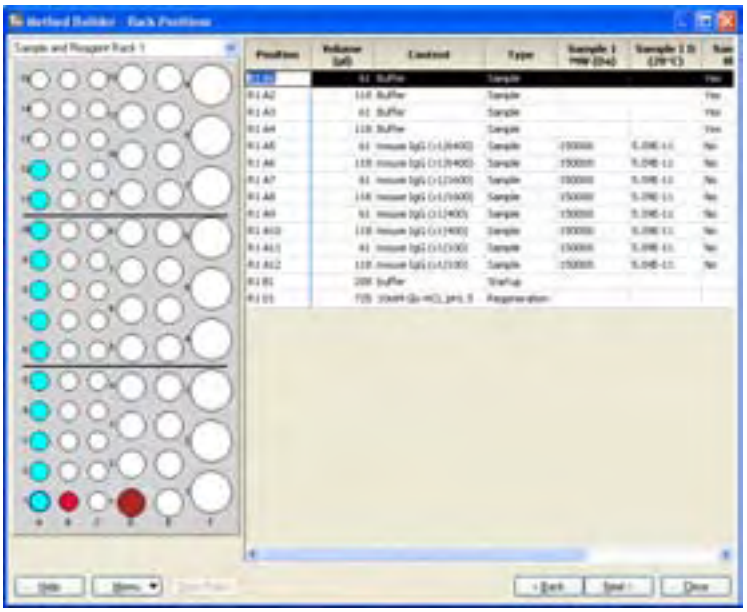
Next >をクリックします。

↓



測定を始める前に、Prime および Normalize をおこなう場合にはチェックを入れます。
入力後、Next >をクリックします。

↓



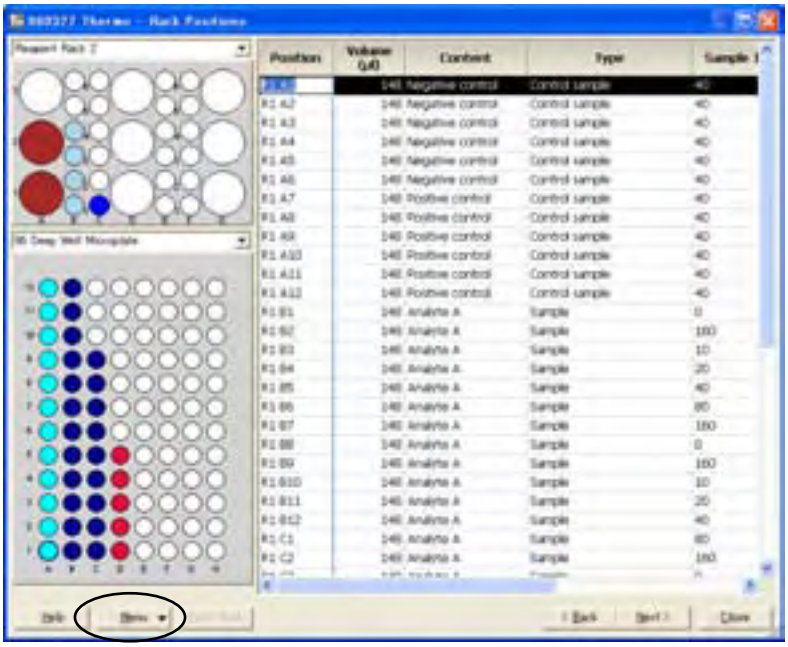
右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 3-13. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import...でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

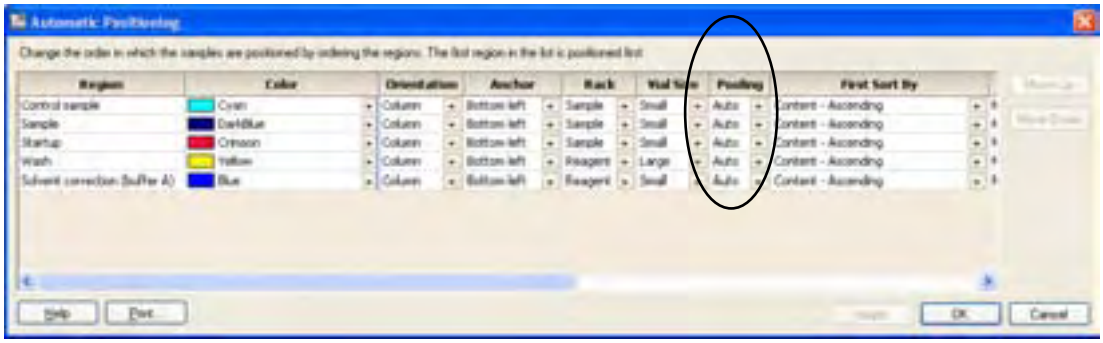
補足 3-14. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。



Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することができます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

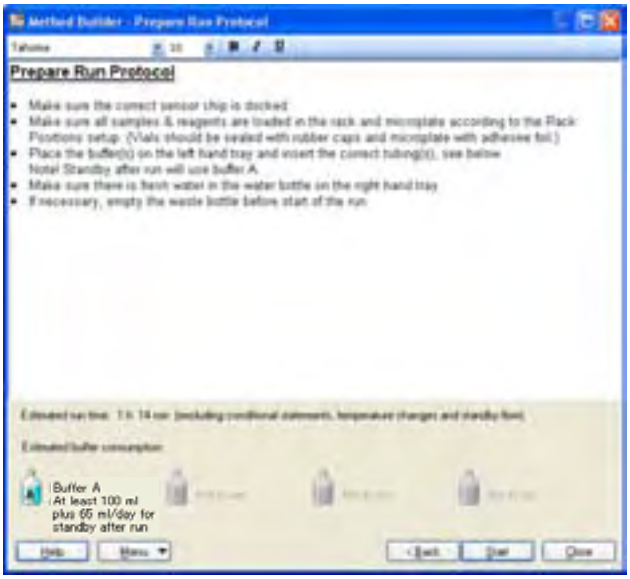
なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、OK をクリックします。Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の Next >をクリックします。

↓

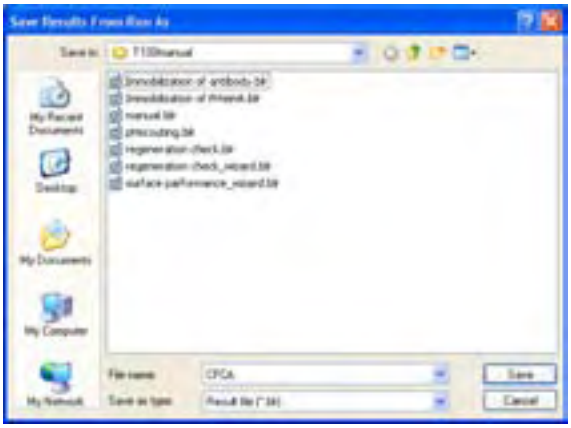


基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don't Save を選択します。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定がスタートします。

↓

↓

終了後、装置は Standby flow 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

補足 3-15. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックします。

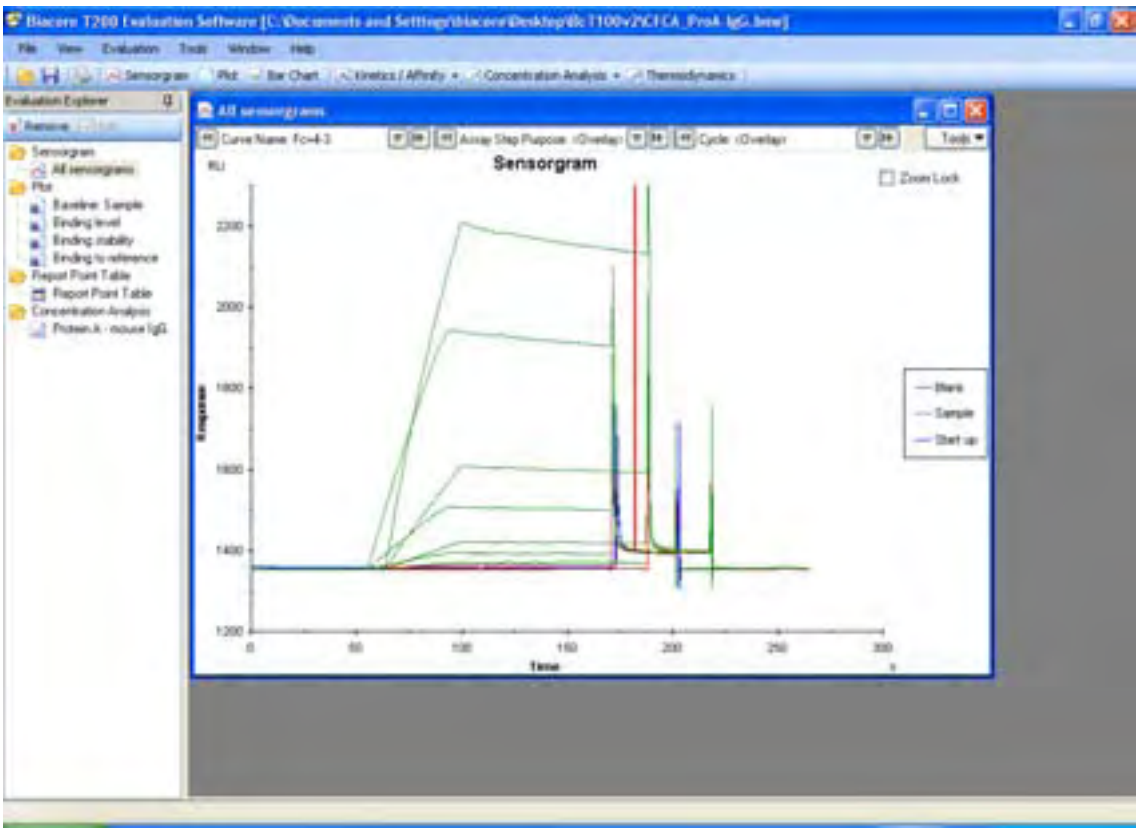
ボックス中の Stop Run をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

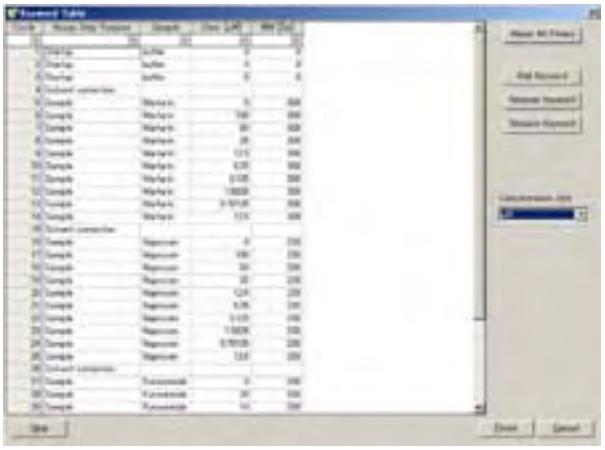
3-2-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

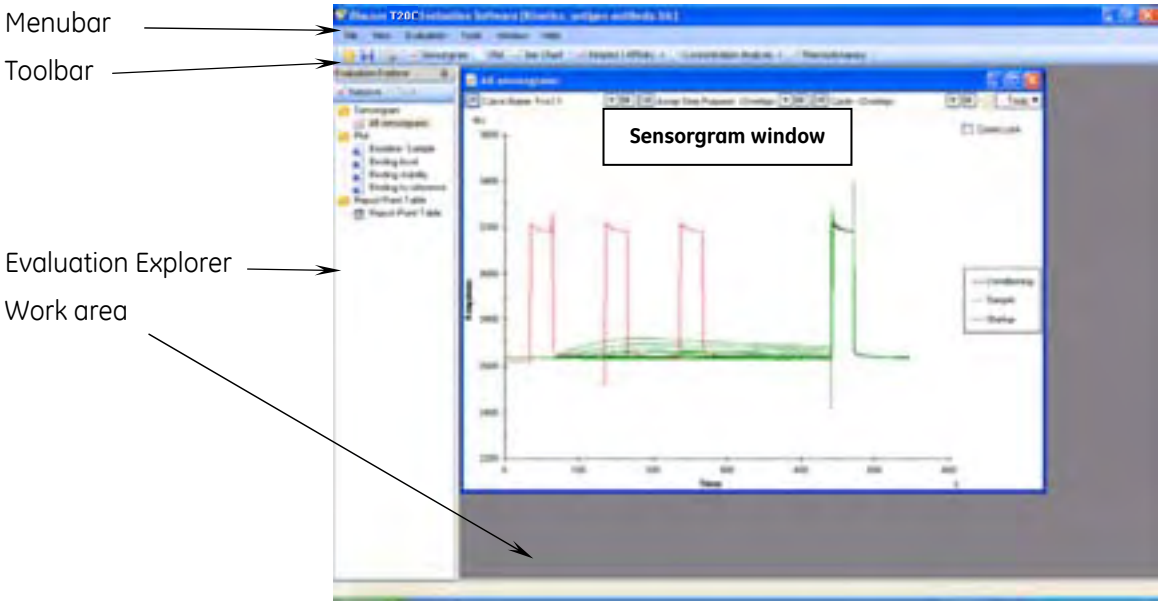


補足 3-16. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table...で変更します。Tools... → Keyword Table...をクリックします。ただし、リガンド名の変更はできません。



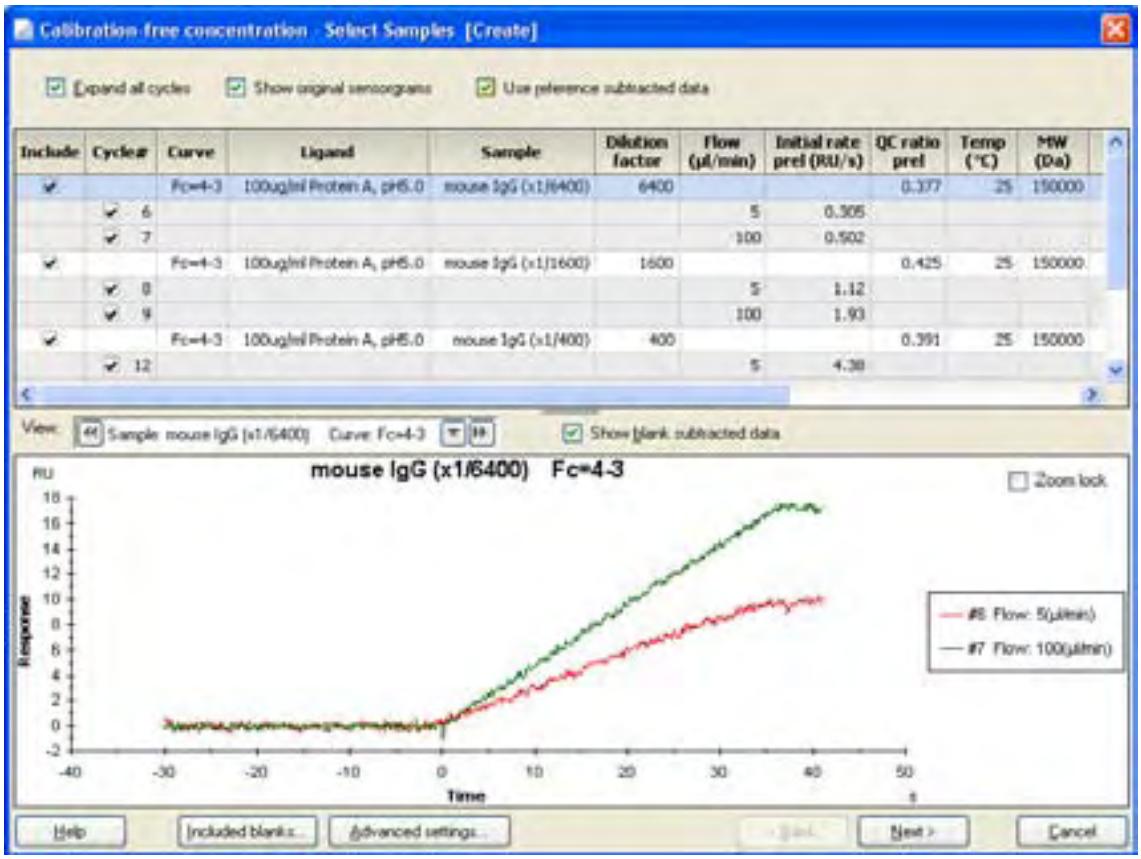
補足 3-17. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Concentration Analysis をクリックし、 Calibration-free をクリックします。

↓



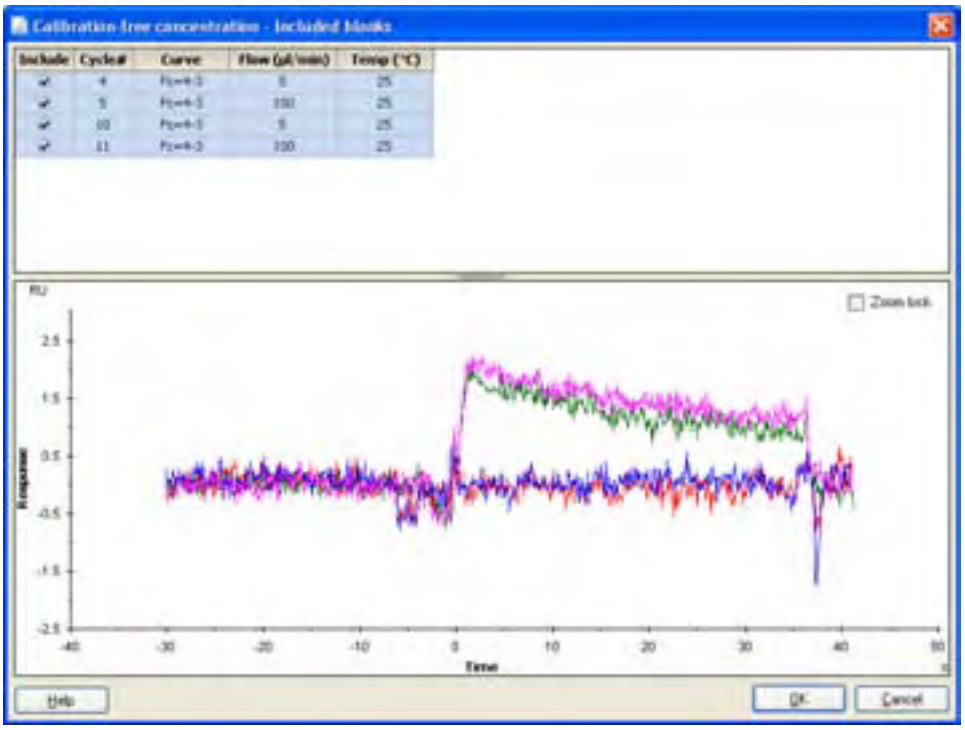
画面上の表に、測定したサンプル情報が、測定サイクル順に表示されます。

Cycle#	測定サイクル番号
Curve	カーブタイプ
Ligand	リガンド名
Sample	アナライト名
Dilution factor	希釈倍率
Flow （µl/min）	測定流速
Initial rate prel （RU/s）	添加開始 10 秒後の 5 秒幅における結合速度（自動計算されます）
QC ratio prel	QC 比（自動計算されます）
Temp （℃）	測定温度
MW （Da）	分子量
D （m^2/s）	測定温度における拡散係数（自動計算されます）
Blank used	ブランクとして利用しているセンサーグラムのサイクル番号

なお、画面上部の Expand all cycles のチェックを外すと、サンプル情報表の表示がサンプル名別のリストに変更します。 リファレンスセルを差し引かないセンサーグラムで解析する場合には、Use reference subtracted data のチェックを外します。

↓

画面左下の、Included blanks... をクリックして、ブランクを確認します。



センサーグラムを確認して、エアーの混入や形状がおかしいブランクは、画面上表の Include のチェックを外します。ブランクセルは差し引かなくても解析は可能です。ブランクを利用しない場合には、Include のすべてのチェックを外します。
選択後、OK をクリックします。

↓

解析に利用できるセンサーグラムを選択します。

補足 3-18. CFCA に利用するセンサーグラムの選択基準

CFCA では、マストランスポートリミテーション条件下のセンサーグラムを解析に利用します。以下の評価基準を満たすセンサーグラムを解析に利用します。

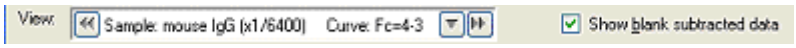
① 低流速の初期速度（Initial rate （ RU / s ） ）= 0.3～15 （ RU / s ）
　＜ 0.3 RU / s では、レスポンスの上昇量が低いため良好な結果が得られません。
　＞ 15 RU / s では、マストランスポートリミテーションが十分ではない可能性があります。

② QC ratio ≧ 0.13
　＜ 0.13 の場合には、マストランスポートリミテーションが十分ではありません。

Include	Cycle#	Curve	Ligand	Sample	Dilution factor	Flow (µl/min)	Initial rate prel (RU/s)	QC ratio prel	Temp (°C)	MW (Da)
	8					5	1.12			
	9					100	1.93			
☑		Fc=4-3	100ug/ml Protein A, pH5.0	mouse IgG (x1/400)	1			0.391	25	150000
	12					5	4.28			
	13					100	7.31			
☐		Fc=4-3	100ug/ml Protein A, pH5.0	mouse IgG (x1/100)	1			nd	25	150000
	14					5	17			
	15					100	26.6			

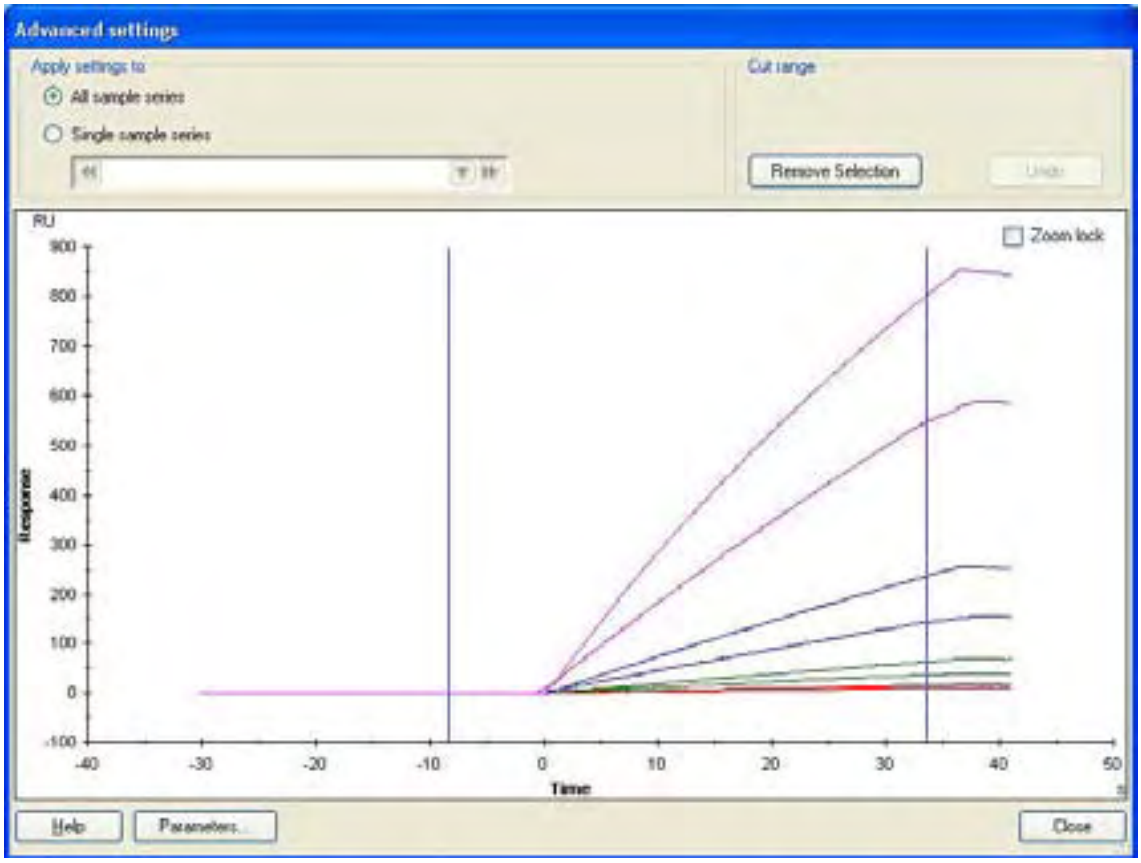
解析に利用しないセンサーグラムは、Include のチェックを外します。

選択したセンサーグラムを確認したい場合には、画面中央の



で選択します。▼をクリックしてセンサーグラムを選択します。Show blank subtracted data のチェックを外すと、リファレンスセルと差し引き前のセンサーグラムを確認できます。
画面右下の Advanced settings>をクリックします。

↓



選択したセンサーグラムの重ね書きが表示されます。
Apply settings to の○ Single Sample series にチェックを入れ、

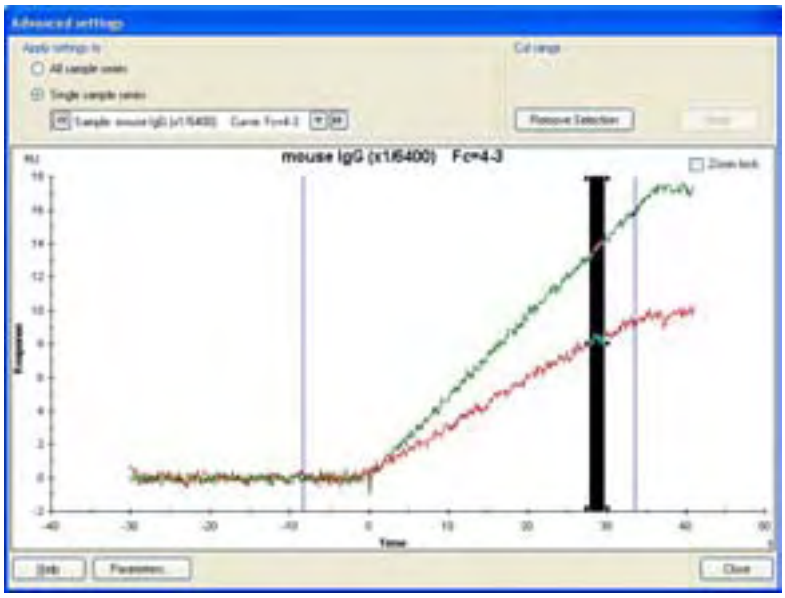
の▼をクリックしてサンプルを選択すると、各サンプルのセンサーグラムの重ね書きに変更できます。
サンプル添加開始 3 秒後から、添加終了 3 秒前の範囲（青いラインで表示）で解析します。この範囲にエアーの混入などによるノイズが確認できる場合には、該当部位を削除します。（補足 3-19 参照）Close >をクリックします。

↓

Next>をクリックします。

補足 3-19. センサーグラムの部分的削除

エアーの混入などで、センサーグラムが乱れている部分は、以下の方法で削除します。
マウスの左ボタンをドラッグし、該当の領域を拡大した後、マウスの右ボタンをドラッグして削除する領域を選択します。拡大図を解除する場合は、白い部分をダブルクリックすると、一つ前の縮小画面に戻ります。



領域をクリックすると、グラフ右上の Remove Selection ボタンがアクティブになります。クリックすると、選択部位が削除されます。Undo をクリックすると、削除前に戻ります。

解析が始まります。

↓

解析が終了すると、画面上部に各サンプルの結果が表示されます。

Meas. Conc　（ M ）　　解析によって算出された濃度

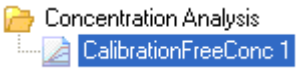
▼をクリックすると単位変更が可能です。

Calc. Conc　（ M ）	希釈倍率を Meas. Conc に掛けた濃度
QC ratio	QC 比
Chi^2　（ RU^2 ）	カイ二乗
SE　（ Meas. Conc ）	Meas. Conc の標準誤差

解析結果の評価については、補足 3-20 を参照してください。
Finish をクリックします。

↓

上記解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。



補足 3-20. CFCA の解析結果の評価

以下の基準を満たしている場合には、良好な結果と判断できます。

① カーブフィッティングが良好である
フィッティングが良好な場合、カーブフィッティングによって得られた黒色のセンサーグラムが、測定センサーグラムと一致します。Chi^2 値が、低流速のセンサーグラムの解離直前の結合量の 5%以下であれば、フィッティングが良好と判断できます。

② SE　(standard error)　が解析結果濃度の 10%以下
SE が算出濃度の 10%以下であれば問題ありません。

③ 解析結果濃度が、0.05～5 µg/ml の範囲内である
範囲外の場合には、①、②の基準にパスしていても結果の取り扱いに注意が必要です。

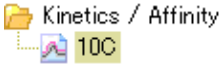
補足 3-21. ファイル名の変更

Evaluation Explorer 中の目的ファイルをクリックします。

↓

上記状態で、キーボードの Backspace キーで、ファイル名を一度削除し、新たに新規ファイル名を入力します。

↓

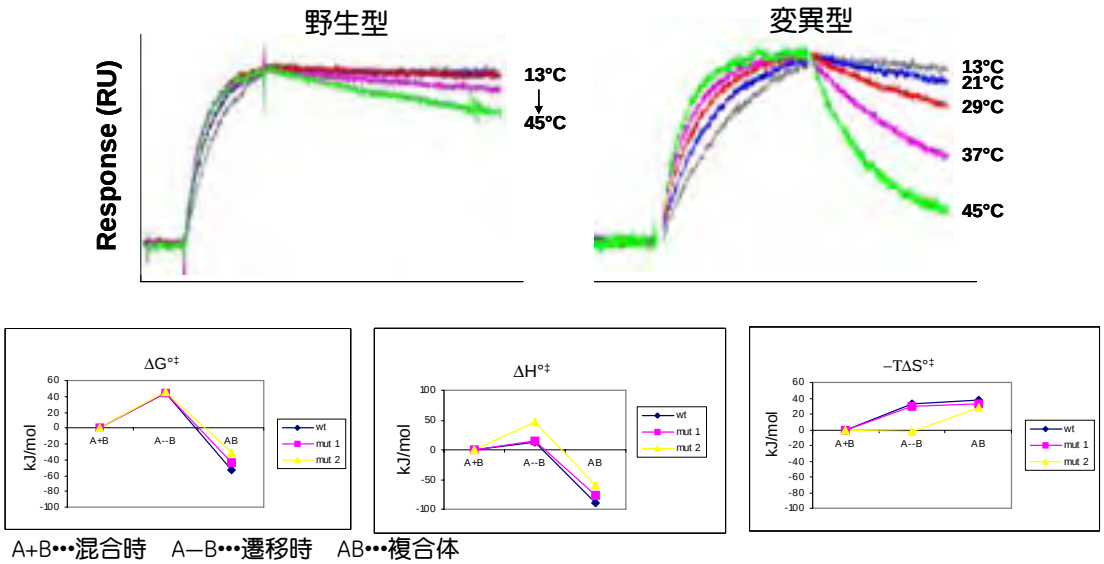


4. 熱力学的パラメータの算出

熱力学的解析

熱力学的パラメータは、分子同士の相互作用メカニズム解析に対して重要な情報を提供します。Biacore では、熱力学的パラメータは、複数の温度条件で速度論的相互作用解析を実施することで算出できます。平衡状態における熱力学的パラメータ（ΔG°、ΔH°、ΔS°）のみならず、遷移状態における熱力学的パラメータ（ΔG°‡、ΔH°‡、ΔS°‡）も算出することが可能です。平衡状態におけるパラメータからは“その分子同士がその強さで結合する理由”、遷移状態におけるパラメータからは“その分子同士がその速度で結合、解離する理由”を議論することができます。

例として、ある抗原（A）と抗体（野生型と 2 種類の変異型、B）の相互作用を紹介します。通常の速度論的解析では、ある温度で相互作用測定を実施し、算出された反応速度定数の比較から野生型と変異型の結合および解離速度の違いを知ることができます。さらに、熱力学的解析の結果からは、下図に示したように、変異型 2 のΔH°‡とΔS°‡が野生型および変異型 1 のそれらとは大きく異なっていることがわかります。すなわち、変異型 2 は野生型および変異型 1 とは異なった様式で相互作用していることが示唆されます。



A+B•••混合時　A—B•••遷移時　AB•••複合体

熱力学的パラメータの解析手順

数段階の温度（4 段階以上）において同一分子間のカイネティクス解析を実施し、解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a, k_d）を算出します。

平衡状態、遷移状態における熱力学的パラメータ算出には、それぞれ次式を応用しています。各温度において算出した解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a, k_d）を代入します。

平衡状態における熱力学的パラメータ算出

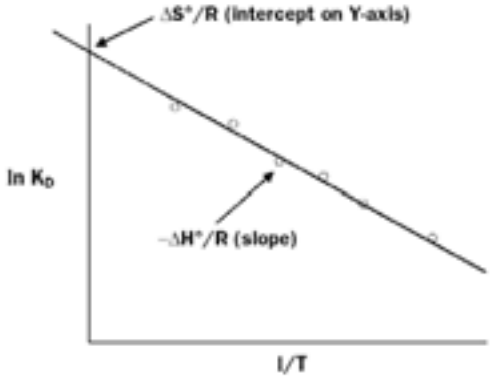
van't Hoff 式を応用します。各温度における解離定数（K_D）を代入し、各種パラメータを算出します。線形解析と非線形解析により算出可能です。

線形解析

$\Delta G^\circ = RT \ln K_D$

$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$

$\ln K_D = \Delta H^\circ / RT - \Delta S^\circ / R$



ΔG°	自由エネルギー変化（kJ/mol）
R	気体定数
T	絶対温度（K）
K_D	解離定数（M）
ΔH°	エンタルピー変化（kJ/mol）
ΔS°	エントロピー変化（J/K・mol）

非線形解析

$$RT\ln K_D = \Delta H^\circ_{T_0} - T\Delta S^\circ_{T_0} + \Delta C_P^\circ(T - T_0) - T\Delta C_P^\circ \ln\left(\frac{T}{T_0}\right)$$

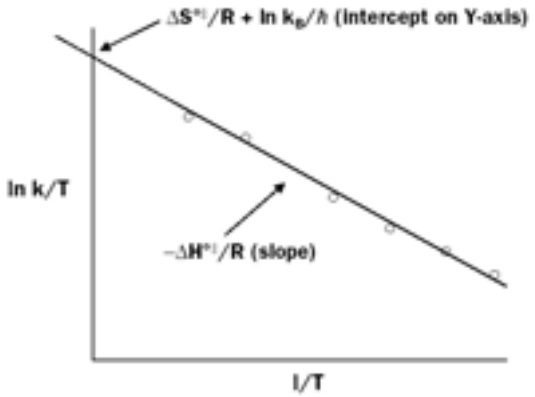
ΔC_p	熱容量変化（kJ/K・mol）
T_0	基準温度（標準状態では 25℃）

遷移状態における熱力学的パラメータ算出

Eyring 式を応用します。各温度における反応速度定数（k_a, k_d）を代入し、各種パラメータを算出します。

$k = （ k_BT / h ） \exp （ \Delta S^{\circ\ddagger} / R - \Delta H^{\circ\ddagger} / RT ）$

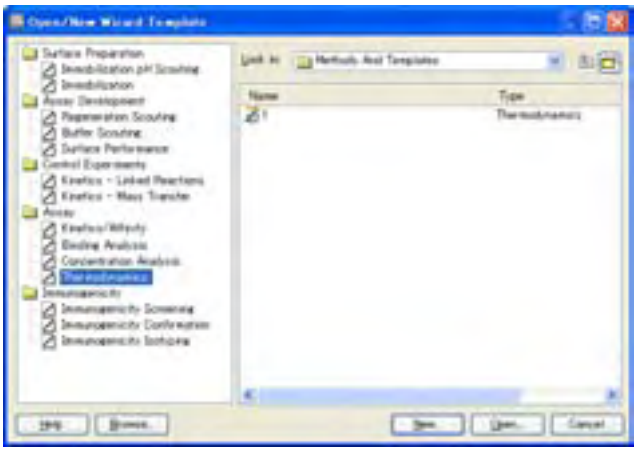
$\ln k / T = \Delta S^{\circ\ddagger} / R - \Delta H^{\circ\ddagger} / RT + \ln kB / h$



k	各反応速度定数
k_B	ボルツマン定数
h	プランク定数
$\Delta S^{\circ\ddagger}$	エントロピー変化（J/K・mol）
R	気体定数
$\Delta H^{\circ\ddagger}$	エンタルピー変化（kJ/mol）
T	絶対温度（K）
$\Delta G^{\circ\ddagger}$	自由エネルギー変化（kJ/mol）

4-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の Run → Wizard...をクリックします。



Assay → Thermodynamics を選択した後、New...をクリックします。以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、Open...をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、Browse...をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして Open...をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。

Detection

Flow path　2-1 もしくは 4-3 を設定します。

Chip

Chip type　利用するセンサーチップを選択します。

Capture

アナライトの添加前に、固定化したキャプチャー分子に対して、リガンドを捕捉する場合にチェックを入れます。リガンドは、フローセル 2 もしくはフローセル 4 にキャプチャーされます。

Sample

アナライトの添加コマンドです

Regeneration

再生が必要な場合にチェックを入れます。添加回数を選択します。(1 or 2)

Carry Over

アナライトのキャリーオーバーを確認する場合にチェックを入れます

Next >をクリックします。

↓

Conditioning

Solution　再生溶液または緩衝液の名称

Contact time　添加時間（s）

Number of injections　添加回数

Startup

Solution　指定した溶液で、相互作用測定と同様の工程をアナライト測定前に実施します。通常は、ランニング緩衝液を用います。

Number of cycles　サイクル数。3 回以上を推奨します。

Solvent correction

低分子化合物がアナライトで溶媒補正が必要な場合にチェックを入れます。

Number of injections　溶媒補正の測定点を選択します。何サンプルごとに溶媒補正を実施するかを、"Repeat after ☐ Sample cycles"で指定します。

Temperatures

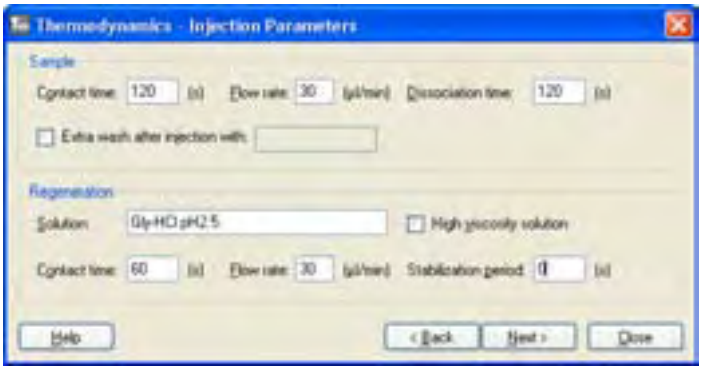
Analysis temperatures　検出部位の温度を設定します。25℃を真ん中に、5 点以上を推奨します。

Sample compartment temperatures

サンプルコンパートメントの温度を入力します。

Next >をクリックします。

↓



Sample

contact time	アナライトの添加時間	120 s
Flow rate	流速	30 µl/min
Dissociation time	解離時間	120 s

Extra wash after injection with

アナライト添加後に指定した溶液で、フローセル以外の流路を洗浄したい場合にチェックを入れます。センサーチップ表面には流れません。

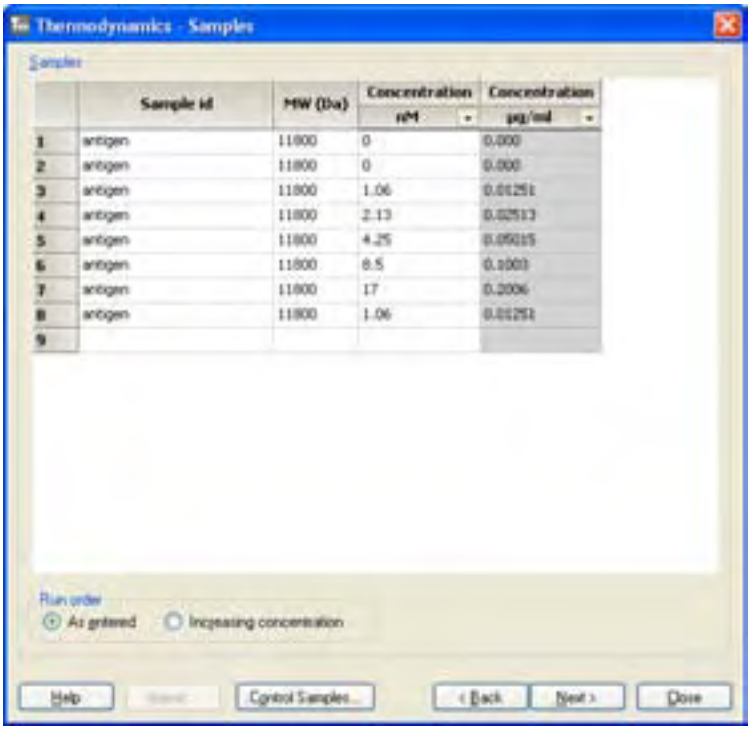
Regeneration

Solution　再生溶液の名称

High viscosity solution	粘性の高い溶液（40%エチレングリコール以上）の場合に選択します	
Contact time	再生溶液の添加時間	60 s
Flow rate	流速	30 µl/min
Stabilization period	添加後のベースライン安定化時間（必要に応じて設定します）	0 s

入力後、Next >をクリックします。

↓



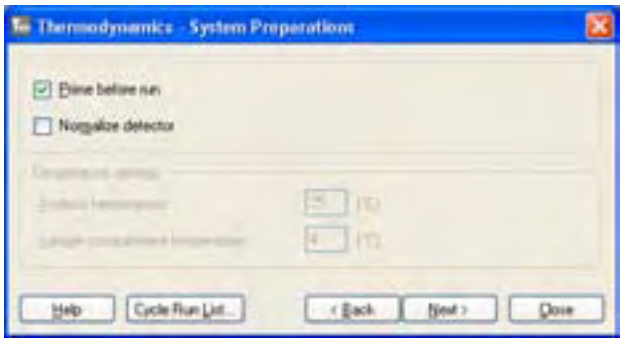
Sample id	アナライトの名称
MW　（Da）	アナライトの分子量
Concentration	アナライトの濃度（単位も選択） 分子量と濃度を入力すると、自動的に“モル濃度 nM”と“重量濃度 µg/ml”を換算します。

入力後、Next >をクリックします。

↓

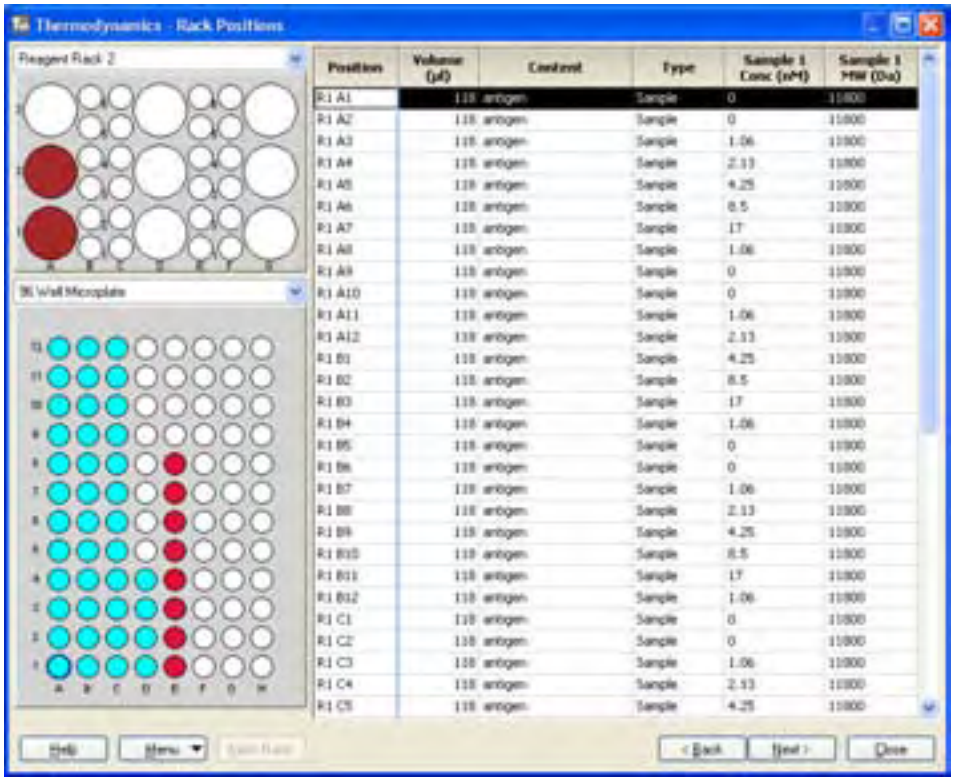
補足 4-1. Excel ファイルで作成したサンプル情報の入力

Excel ファイルで作成したサンプル情報を移行するには、Excel での保存時、タブ区切りのテキストファイル（拡張子は txt）を選択します。タブ区切りで保存したデータを上記画面で開き、コピーペーストで入力します。



測定を始める前の Prime before run および Normalize detector の実施を選択します。

↓



右側の表でサンプルの位置と容量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 4-2. サンプル位置の変更

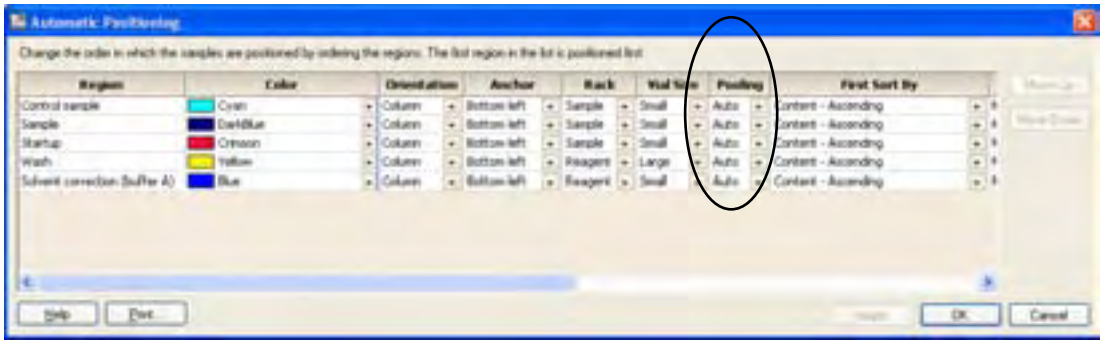
サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import...でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。

補足 4-3. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。

Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することができます。

“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。

同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

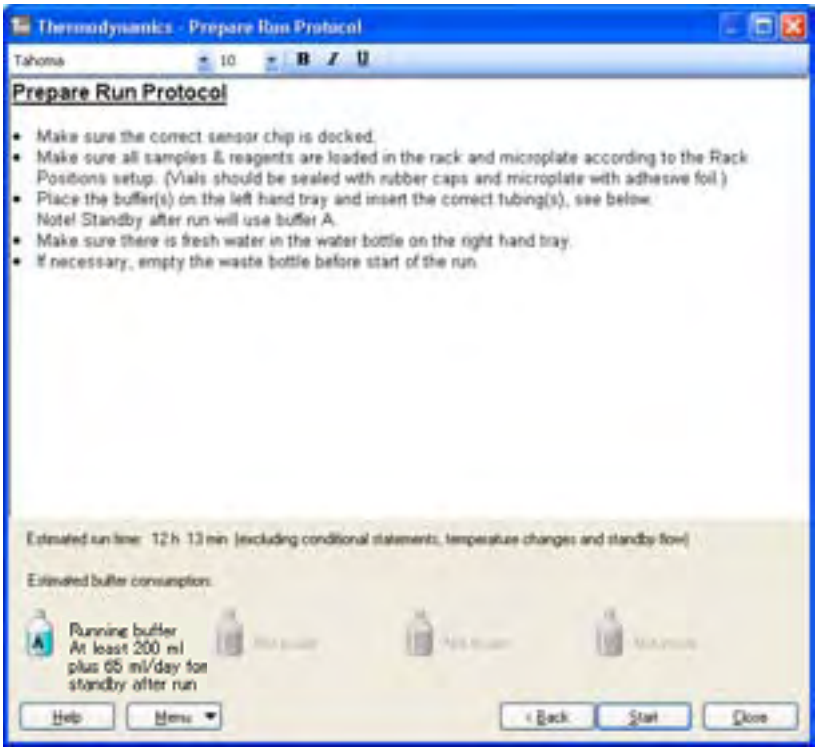
Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、OK をクリックします。

Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の Next >をクリックします。

↓


Thermodynamics - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 12 h 13 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
At least 200 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
Help
Menu
< Back
Start
Close

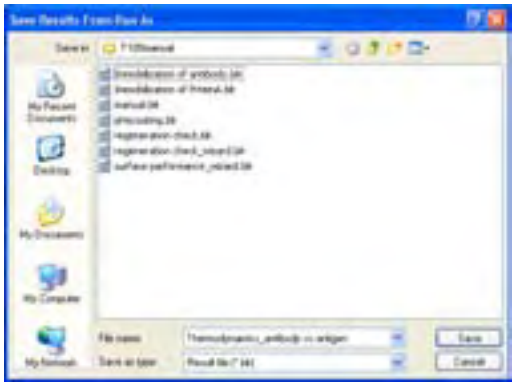
基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。

Start をクリックします。

↓

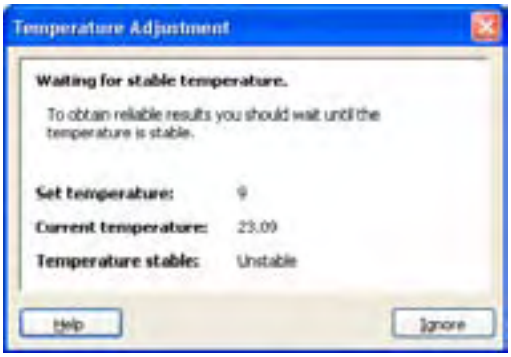
設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don't Save を選択します。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定がスタートします。

↓



設定温度に達するまで、上記ウインドウが表示されます。設定温度に達すると測定が開始されます。

↓

測定終了後、装置は Standby flow 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動します。

補足 4-4. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックします。

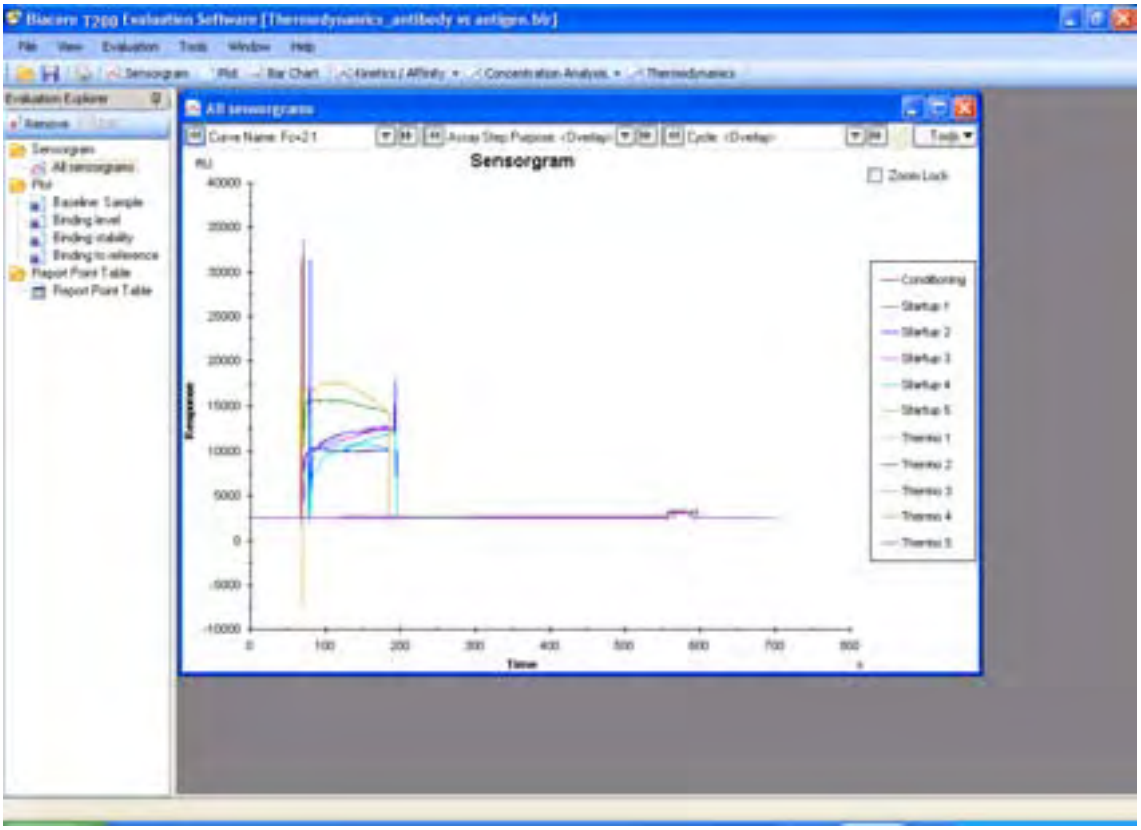
ボックス中の Stop Run をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

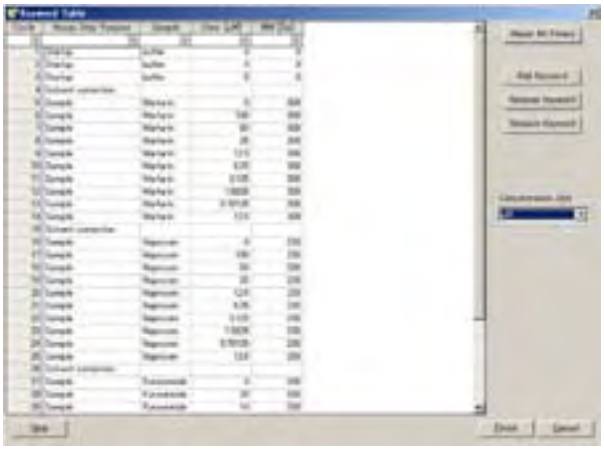
4-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

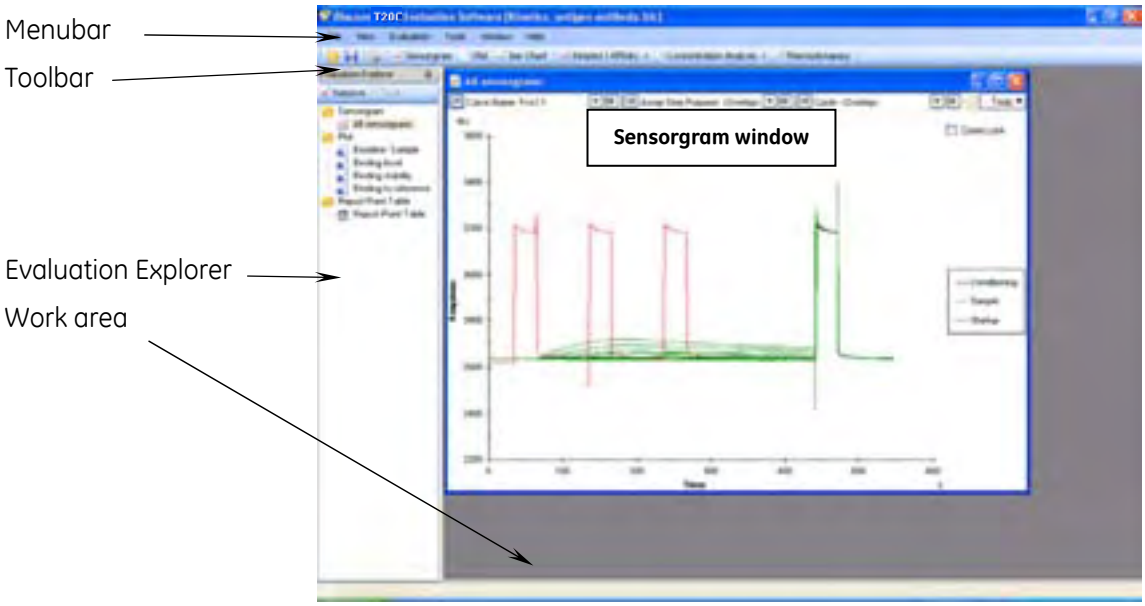


補足 4-5. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword Table...で変更します。Tools... → Keyword Table...をクリックします。ただし、リガンド名は変更できません。



補足 4-6. 画面の説明

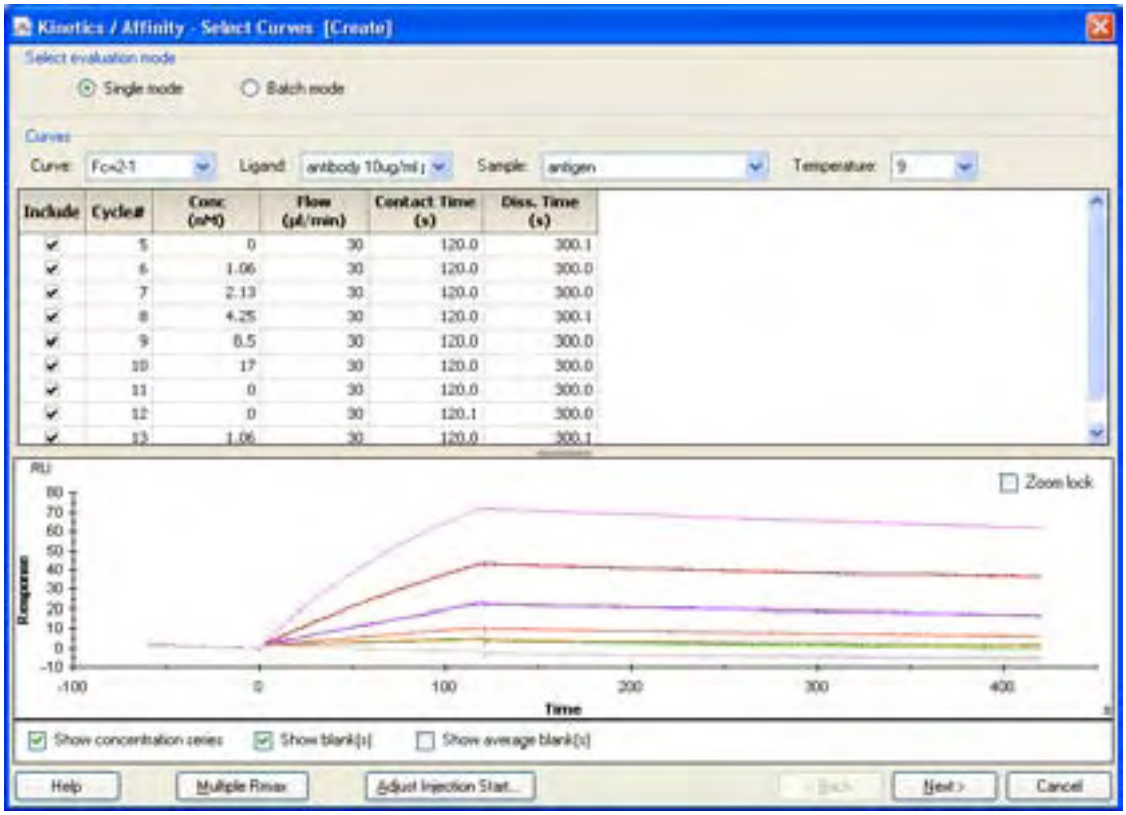


Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

各温度における解離定数（K_D）、反応速度定数（k_a,k_d）を算出します。
詳細は Biacore T200 日本語取扱説明書 –基本操作編-を参照してください。

Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックします。

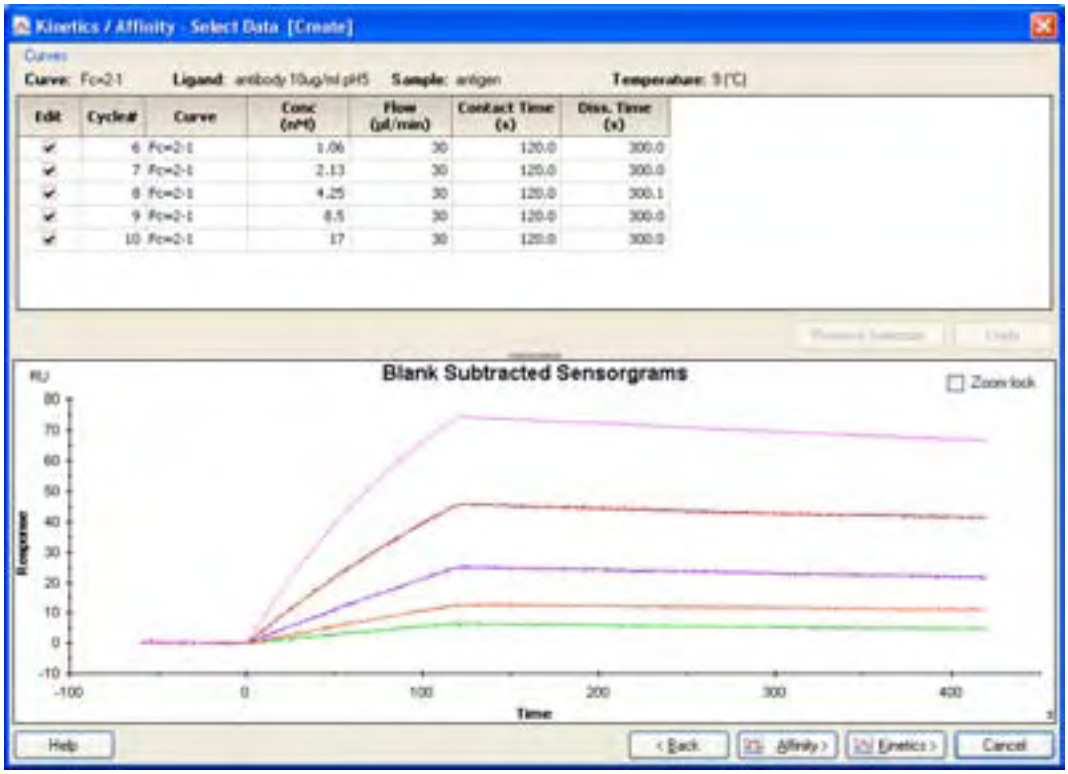
↓



同一温度、同一サンプル名のセンサーグラムがすべて重ね書き表示されます。

Select Evaluation mode で Single mode を選択します。
Next >をクリックします。

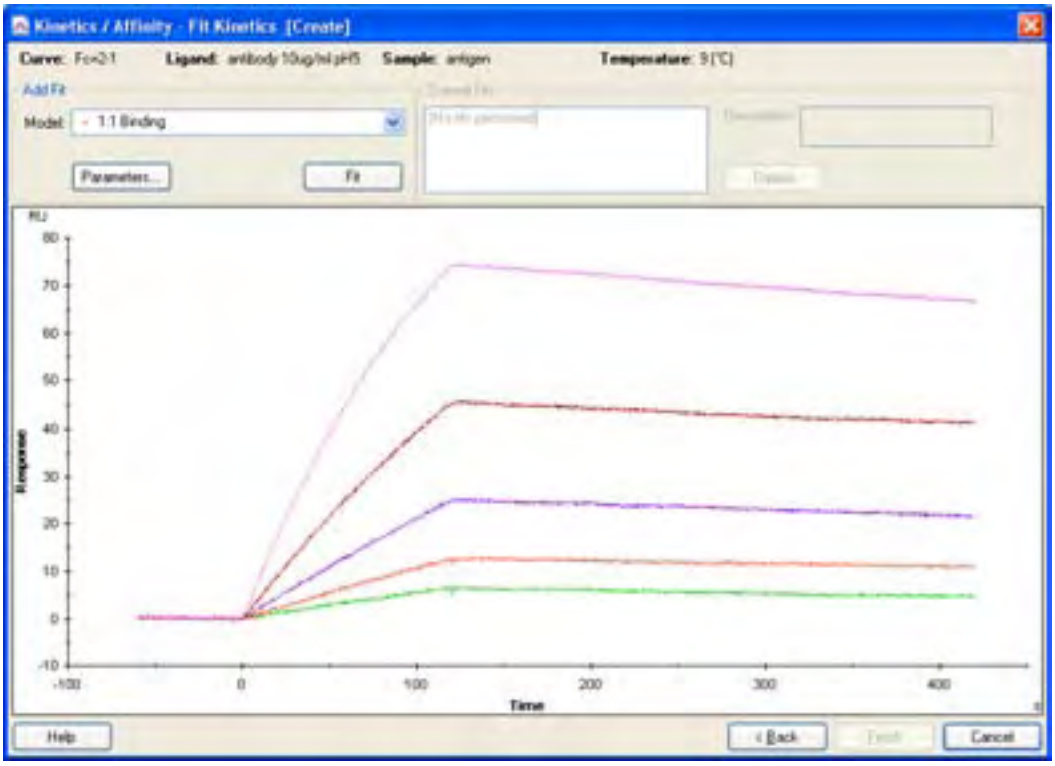
↓



濃度 0 のセンサーグラムが、ブランクとして、全センサーグラムから差し引かれます。

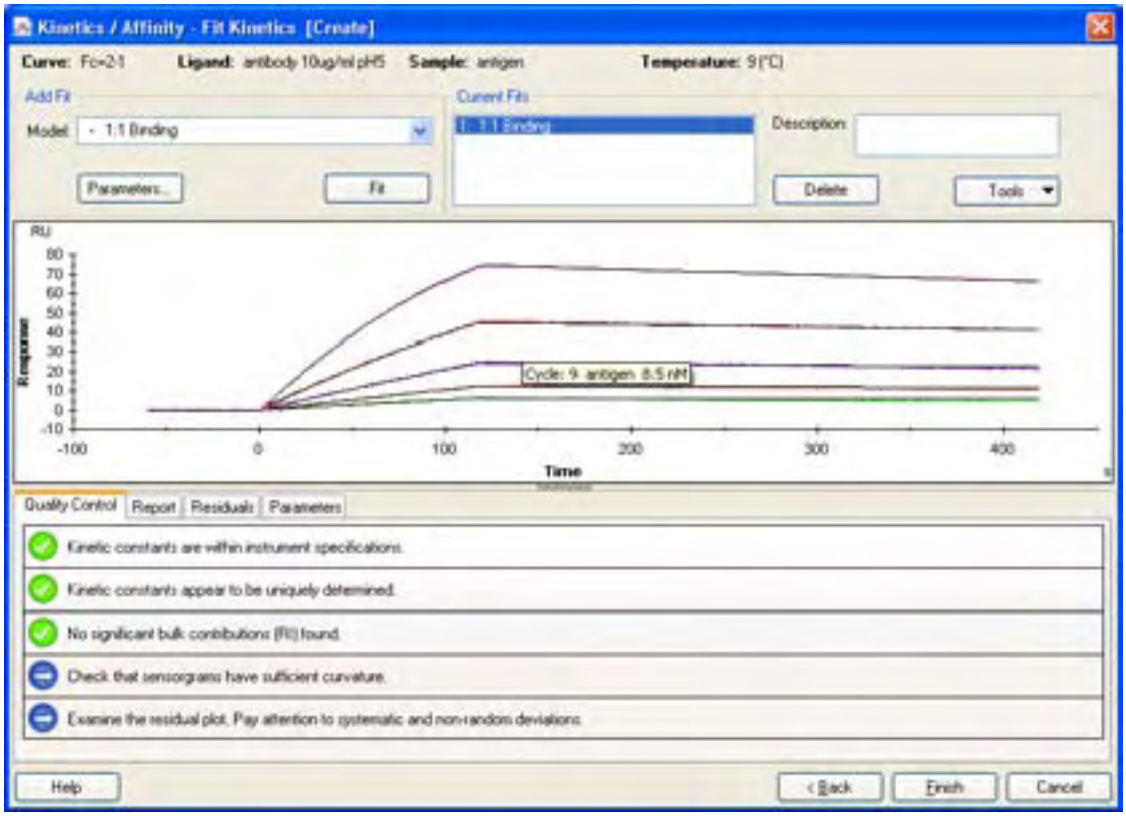
Kinetics >をクリックします。

↓



Model:に、1:1 Binding を選択します。Fit をクリックします。

↓



Finish をクリックします。

↓

上記解析結果が、Evaluation Explorer 中のフォルダに追加保存されます。ファイル名は自動的にサンプル名が採用されます。

この実験では、測定温度を変化させて、同一サンプルで同様の実験を行うため、どの温度についての解析結果も同一ファイル名（サンプル名）で保存されます。混乱を避けるため、この時点でファイル名を変更することを推奨します。

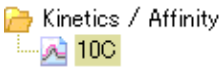
補足 4-7. ファイル名の変更

Evaluation Explorer 中の目的ファイルをクリックします。

↓

上記状態で、キーボードの Backspace キーで、ファイル名を一度削除し、新たに新規ファイル名を入力します。

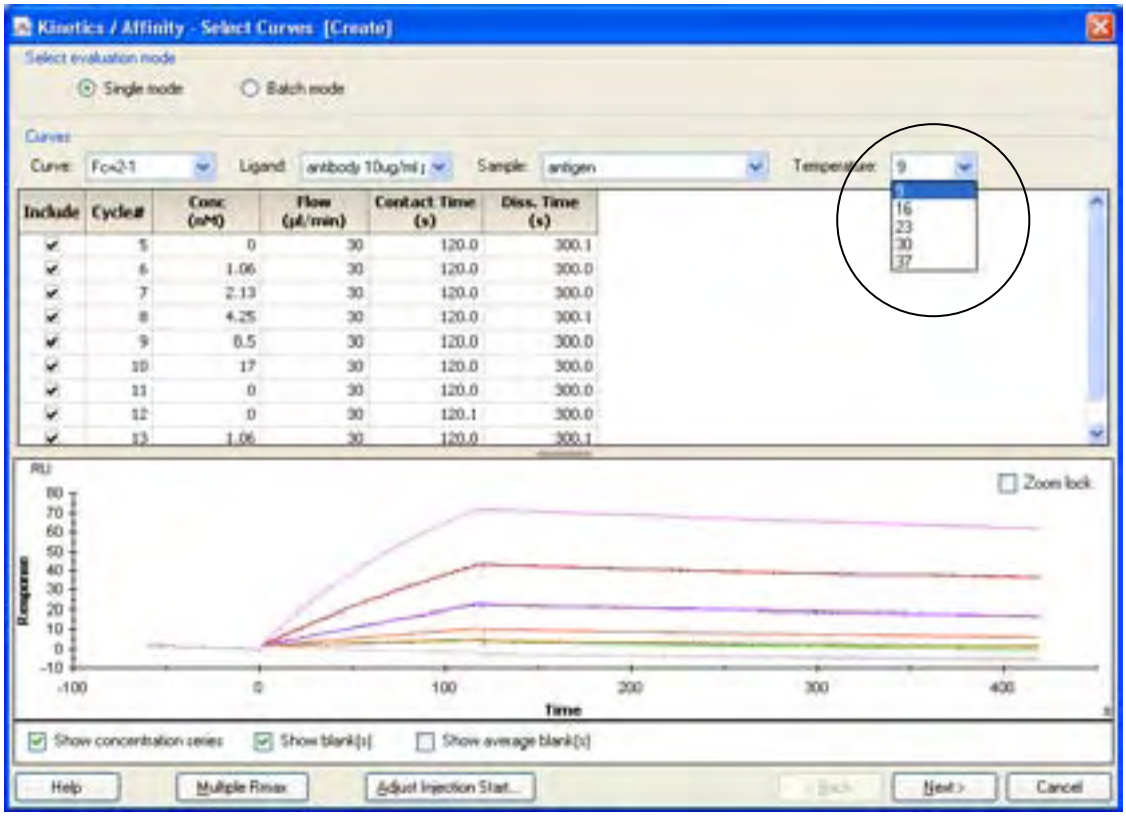
↓



同様に、別の温度の測定データについても解析します。

Toolbar の Kinetics / Affinity をクリックします。

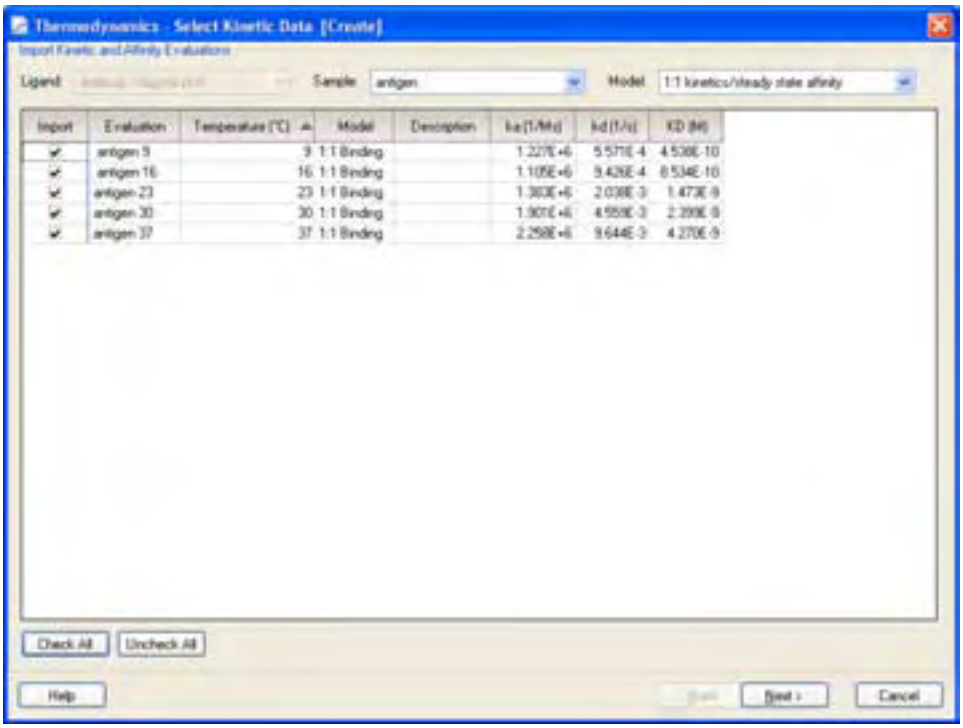
↓



Temperature 右側の▾をクリックします。温度を変更し、反応速度定数（k_a,k_d）を算出します。

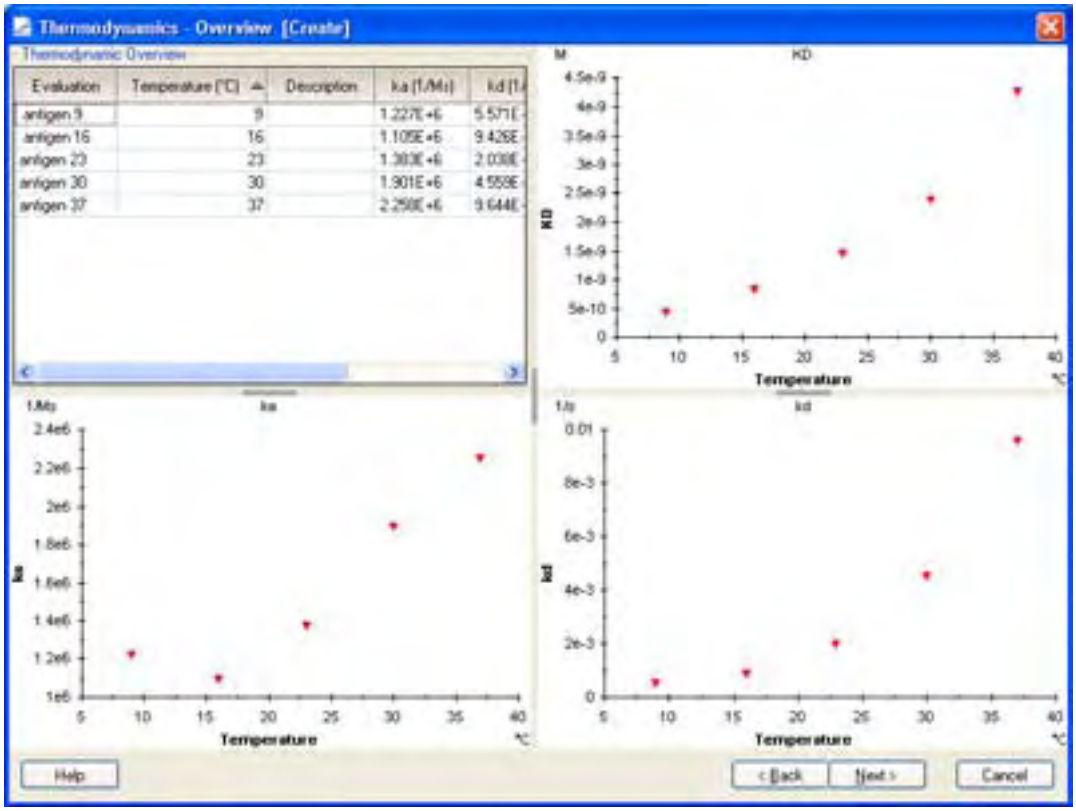
↓

すべての温度について解析終了後、Toolbar の Thermodynamics をクリックします。自動的に全解析結果がテーブルに表示されます。



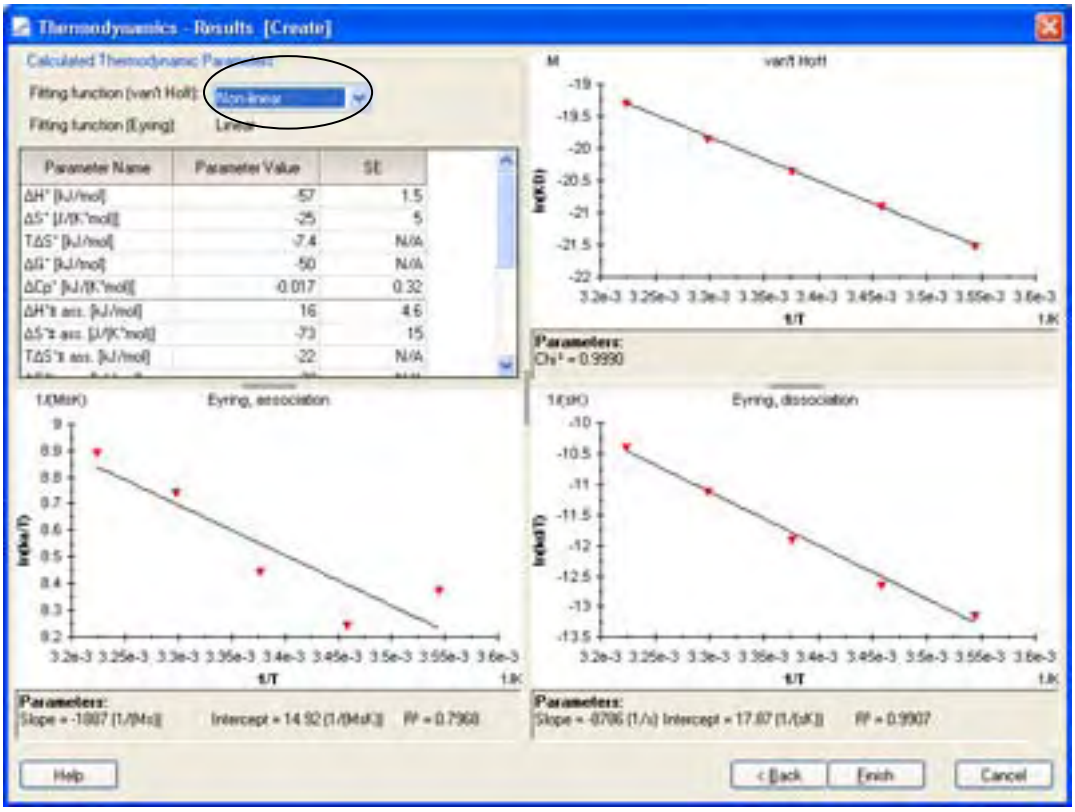
Import をチェックし、Thermodynamics に利用するデータを選択します。Check All をクリックするすると、全データが選択されます。Next >をクリックします。

↓



温度に対する解離定数、反応速度定数のプロットが表示されます。Next >をクリックします。

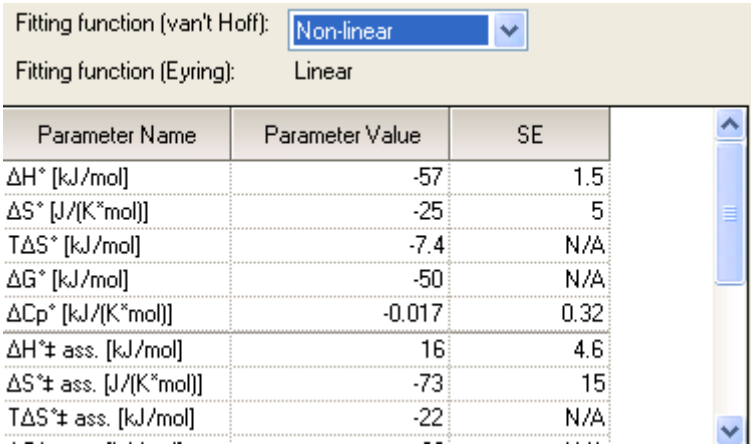
↓



から、線形解析（Linear）または非線形解析（Non-linear）を選択します。

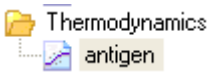
選択した解析手法の結果が表示されます。

すべての熱力学的パラメータは、左上のテーブルに表示されます。



Finish をクリックします。

上記解析結果は、Evaluation Explorer 中の Thermodynamics フォルダに追加されます。ファイル名は自動的にサンプル名が採用されます。



5. 結合アナライトの回収

固定化したリガンドに対して結合したアナライトを回収します。再生溶液を添加し、溶出されたアナライトを引き戻すようにして指定したバイアルに回収します。1 回の回収容量はおよそ 2 µl です。効率よく回収するためには、アナライトの添加条件と回収溶液の条件が重要となります。

アナライトの添加条件

できるだけ高濃度のアナライトを用いる方が、1 度の添加でより効率よくアナライトを回収することができます。特に低親和性の結合ではアナライト濃度が回収率に大きく影響します。血清等のアナライトの添加では、センサーチップ表面へ非特異的吸着が生じやすく、目的分子以外の分子も回収されます。このような場合には、希釈倍率をあげて非特異的吸着を低減させるなどの検討が必要となります。また、1 度に回収される量は微量であるため、結合量から、何回程度繰り返し結合回収が必要か確認する必要があります。

回収溶液

再生溶液が回収溶液となります。再生できなければ、アナライトを回収することができないので、あらかじめ、マニュアル測定で再生条件を検討します。

質量分析に回収サンプルを直接持ち込む場合は、サンプルの酸性化が必要です。低濃度の酸は、結合したアナライトを再生するのに適している場合が多く、回収溶液に 0.5 % TFA や 0.1 %酢酸を利用すれば、回収サンプル溶液を直接質量分析で解析することができます。質量分析の前に ZipTip（Millipore）などのマイクロ逆相カラムで精製する場合には、回収溶液として、アルカリ溶液（50 mM NaOH など）も使用できます。

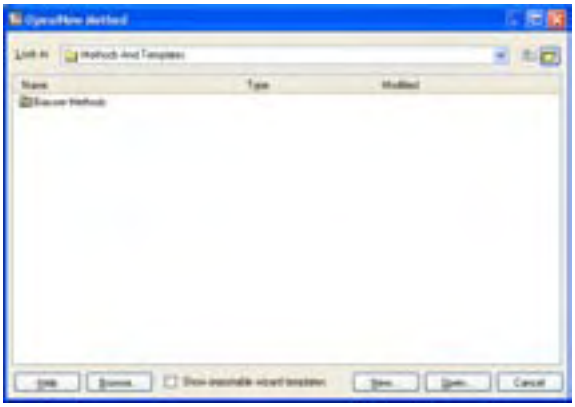
回収前の洗浄溶液

相互作用測定時の緩衝液には、質量分析を阻害する成分（例；NaCl、Surfactant P20、DMSO、リン酸緩衝液など）が多く含まれています。回収サンプル溶液中への、これらの成分の混入を抑えるために、アナライト添加直前にセンサー表面や流路を洗浄する必要があります。その洗浄溶液として、炭酸水素アンモニウムなどの揮発性の緩衝液が用いられます。

5-1. プログラムの実行

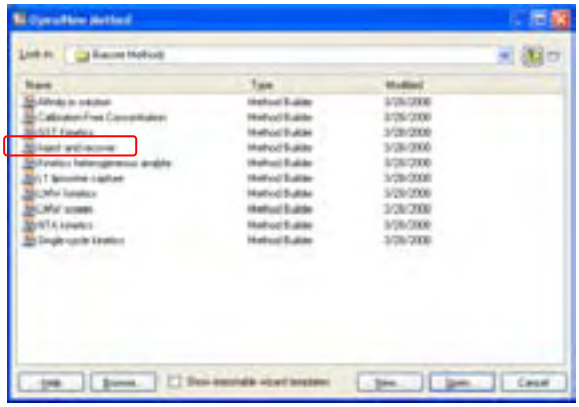
Toolbar の Run Method アイコン（ ）または Menu bar の Run → Method...をクリックします。

↓



Biacore Methods をダブルクリックします。

↓

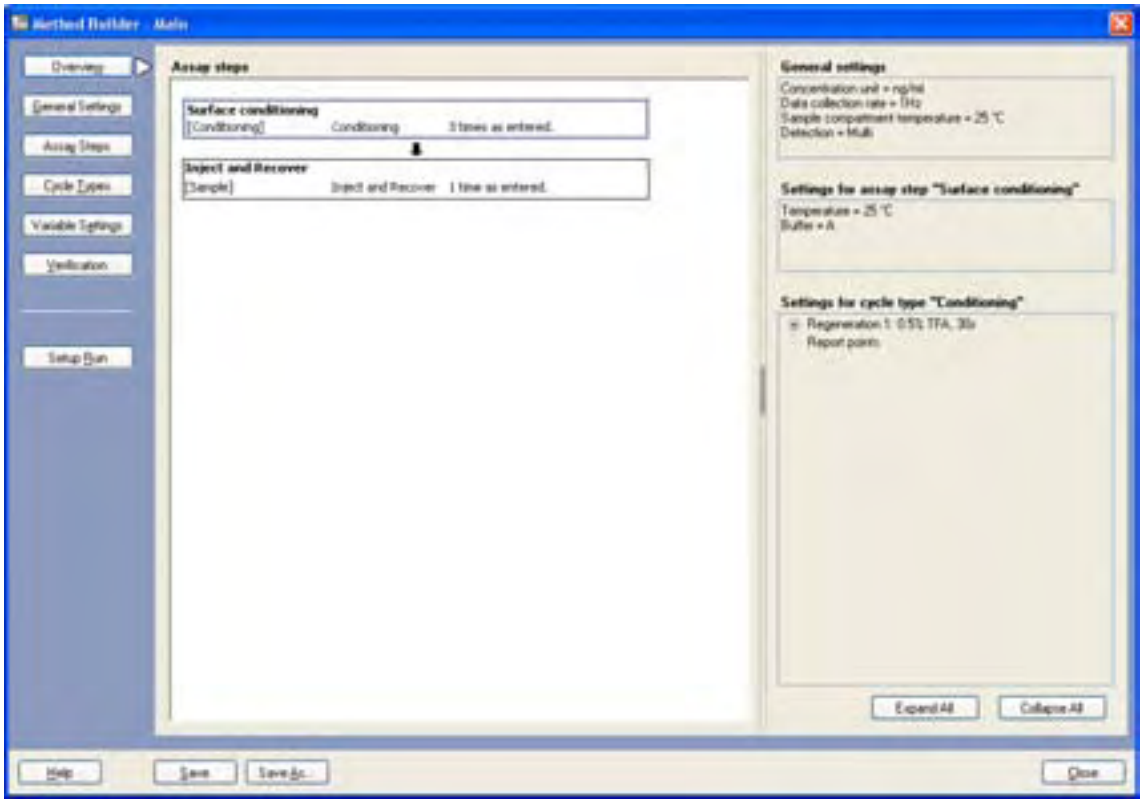


Inject and recover をハイライトにし、Open...をクリックします。

↓

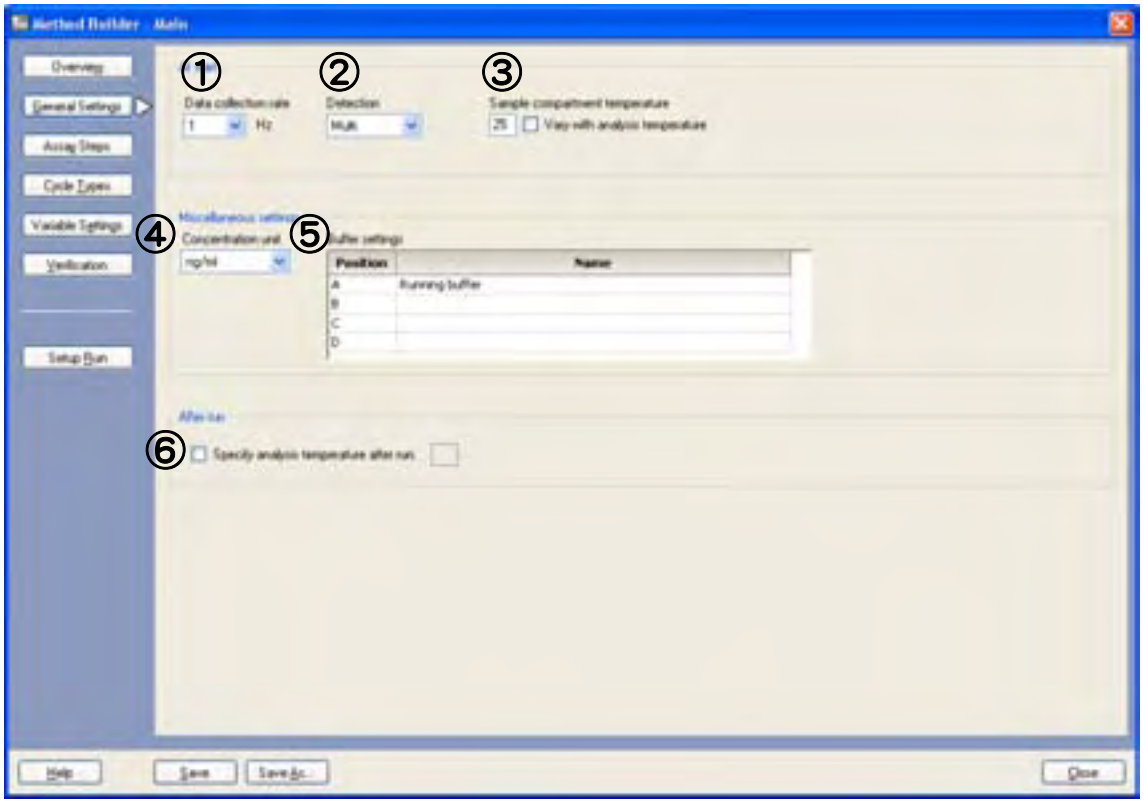
Method Builder の Main ダイアログが表示されます。

Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示されます。以下に変更項目について記載します。詳細は Biacore T200 日本語取扱説明書 -基本操作編-を参照してください。



General settings をクリックします。

↓



① Data collection rate

1Hz を選択します。

② Detection

Multi を選択します。設定の変更不可。1、2、3、4 に流れます。

③ Sample compartment temperature

サンプルコンパートメントの温度（4～45℃）を設定します。通常は、25℃。

④ Concentration unit

アッセイ全体を通して用いる濃度単位を選択します。

⑤ Buffer settings

使用するランニング緩衝液名を入力します。

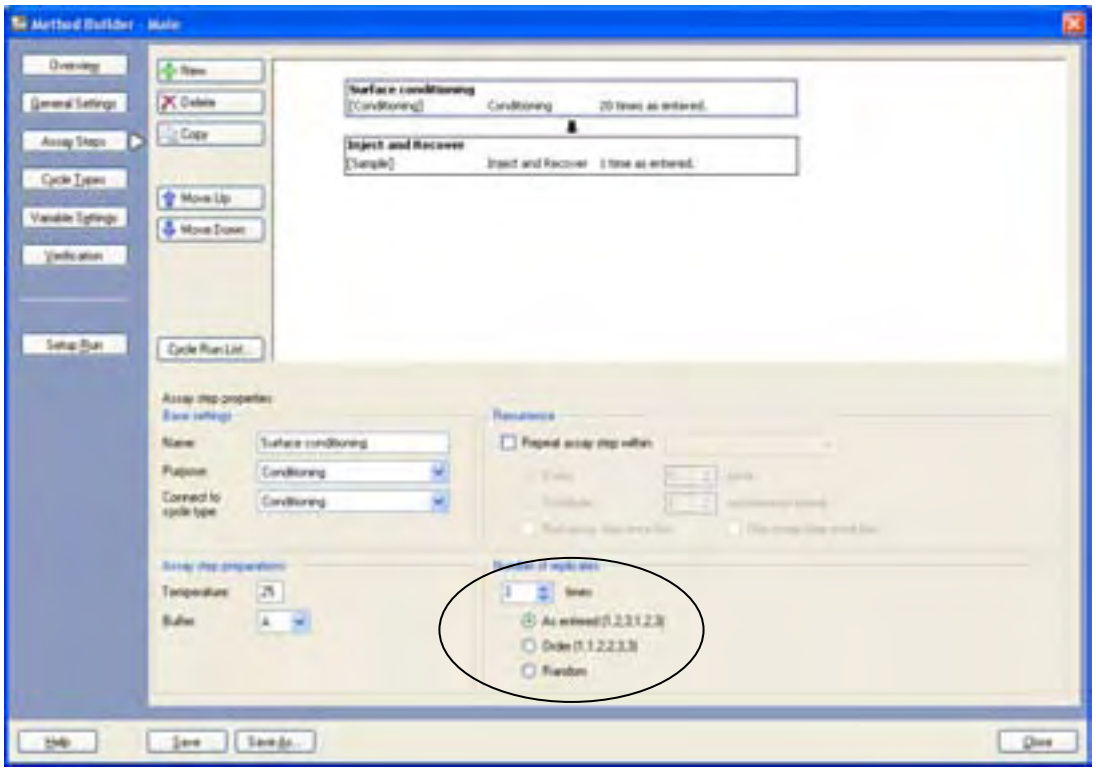
⑥ After run

チェックを入れておくと、全測定が終了した後にセンサー表面の温度が指定した温度に自動変更されます。

設定後、Assay Steps をクリックします。

↓

Surface conditioning をクリックする。



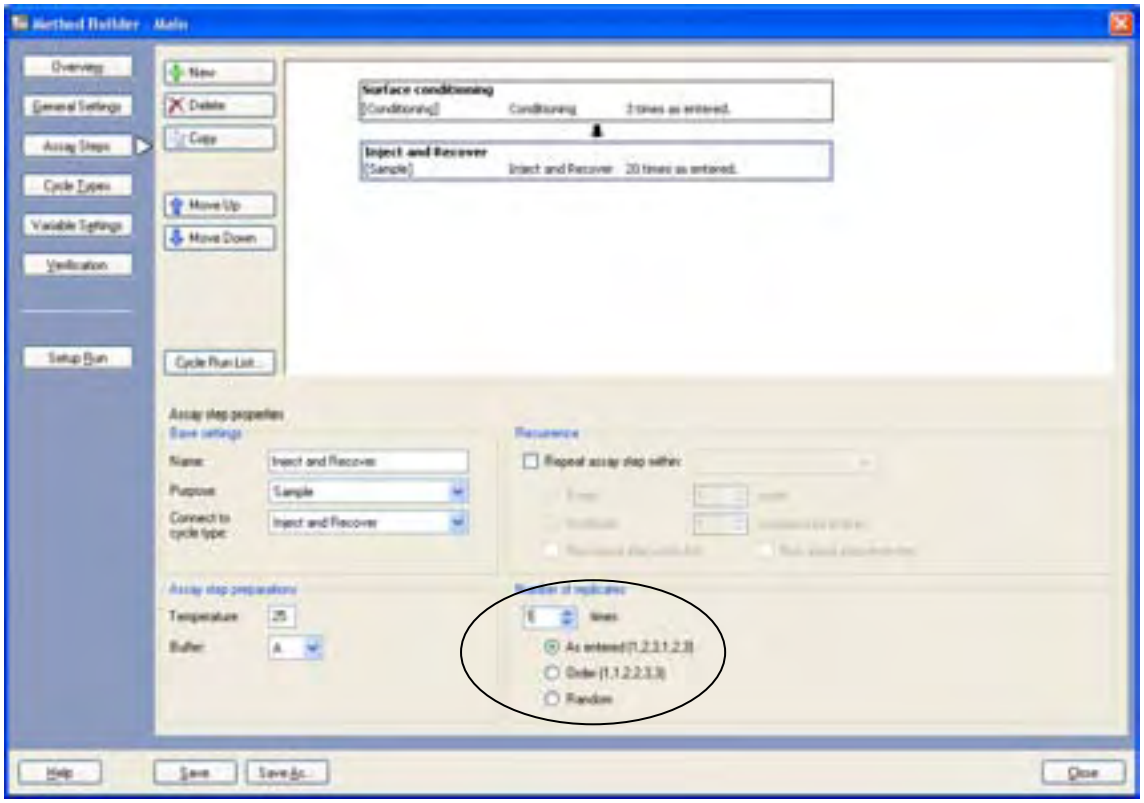
Number of replicates

Times　　スタートアップの測定回数を指定します。3 回以上を推奨します。

↓

Inject and Recover をクリックします。

↓



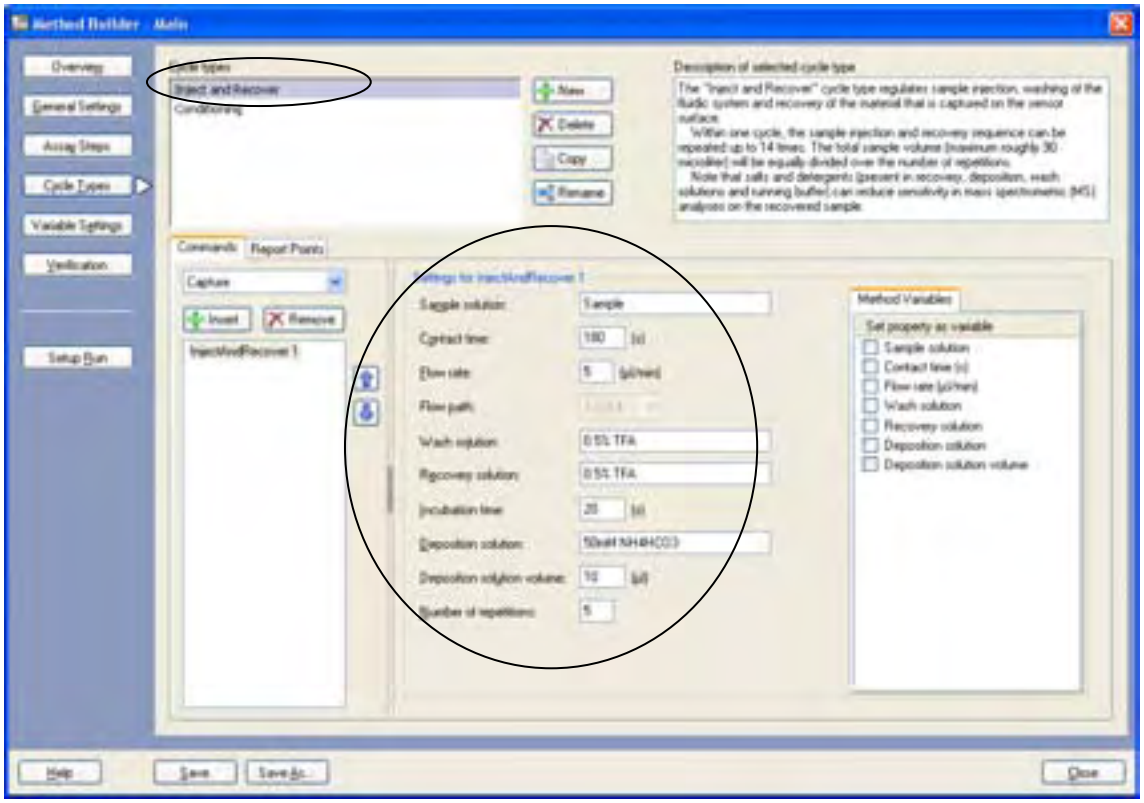
Number of replicates

Times　　回収サイクルの実施回数を入力します。

Cycle Types をクリックし、次画面に移動します。

↓

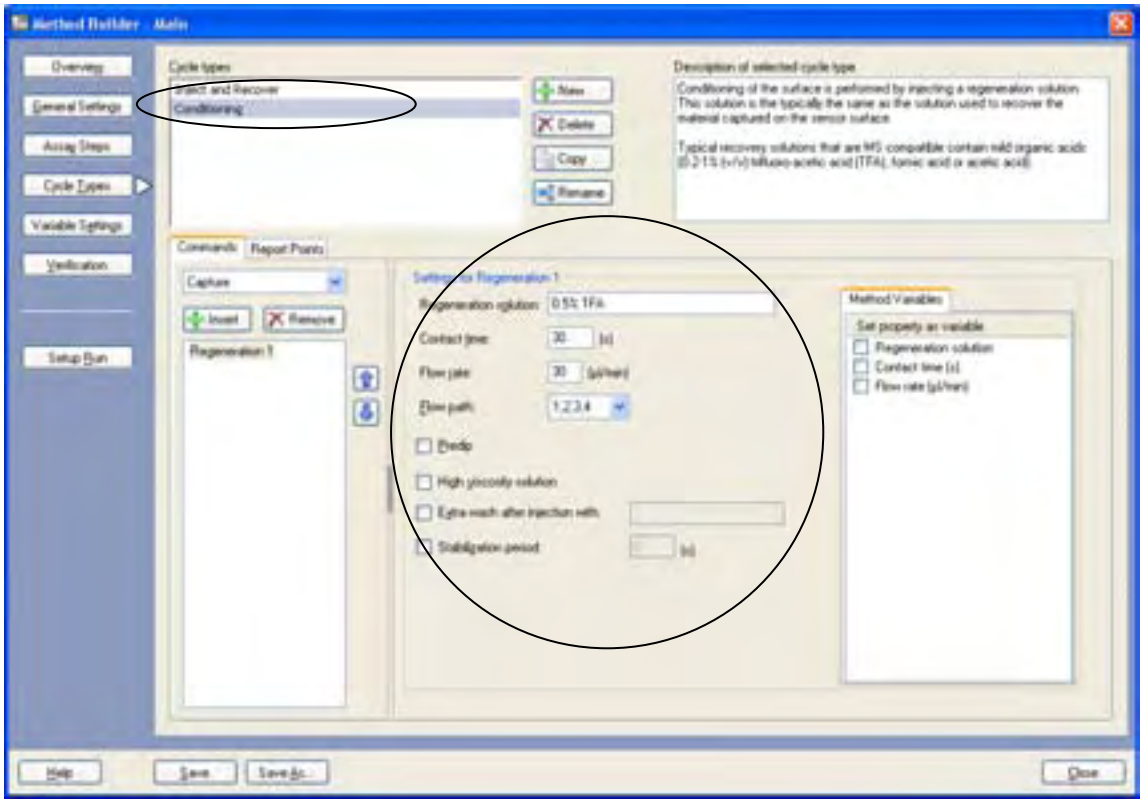
Inject and Recover をクリックします。



Sample solution	アナライトの名称
Contact time	アナライト添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Flow path	1, 2, 3, 4。変更不可。
Wash solution	アナライト添加前のフローシステムの洗浄溶液
Recovery solution	マニュアル測定で条件検討した再生溶液を入力します。回収溶液は、ランニング緩衝液との希釈を防ぐためにエアーセグメントをはさんでフローセルに添加されます。フローセルに到達したところで流速は 0 になり、接触時間（Incubation time）分留まります。
Incubation time	回収溶液の接触時間（s）を入力します。
Deposition solution	回収溶液を中和する緩衝液を入力します。また、トリプシンやプロテアーゼも使用可能です。 アナライト添加前に、回収先となるバイアルに設定容量分を自動分注します。
Deposition solution volume	中和溶液の分注量（µl）を指定します。
Number of repetitions	1 サイクル中の添加・回収回数を入力します。最大 10 回まで可能です。回収量を稼ぎたい場合に設定します。

↓

Conditioning をクリックします。



回収サイクル前のセンサーチップのコンディショニング条件を設定します。

Regeneration solution	再生溶液を入力します
contact time	添加時間（s）
Flow rate	流速（µl/min）
Flow path	1, 2, 3, 4 を選択します

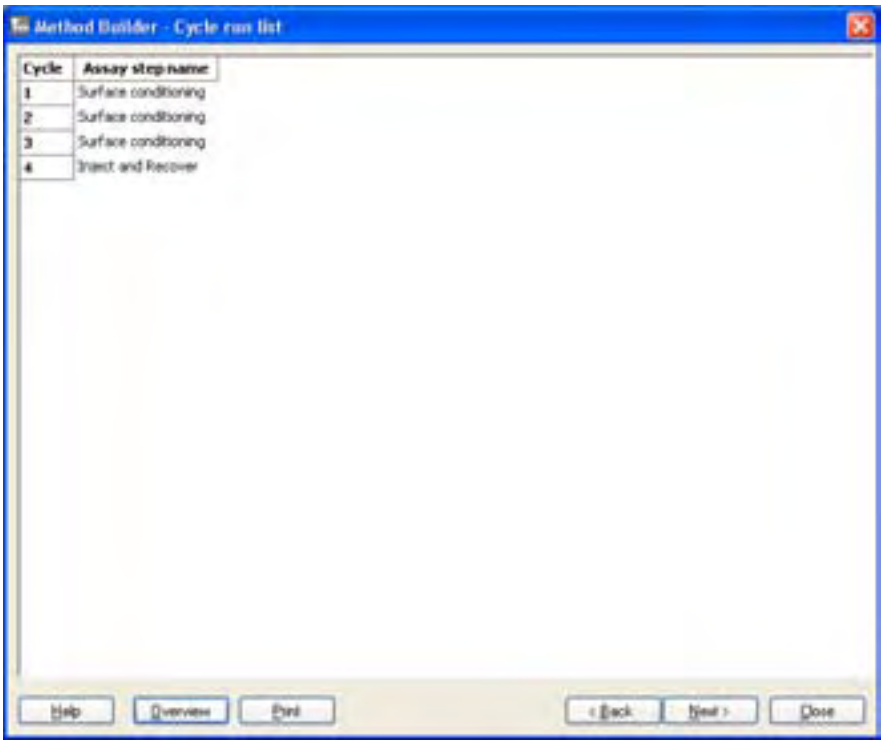
Setup Run をクリックします。

↓

Flow path:	1, 2, 3, 4 を選択します

Next >をクリックします。

↓



測定サイクルリストが表示されます。

Next >をクリックします。

↓

測定を始める前の Prime および Normalize の実施を選択します。

Temperature settings

Analysis temperature	25 ℃
Sample compartment temperature	25 ℃

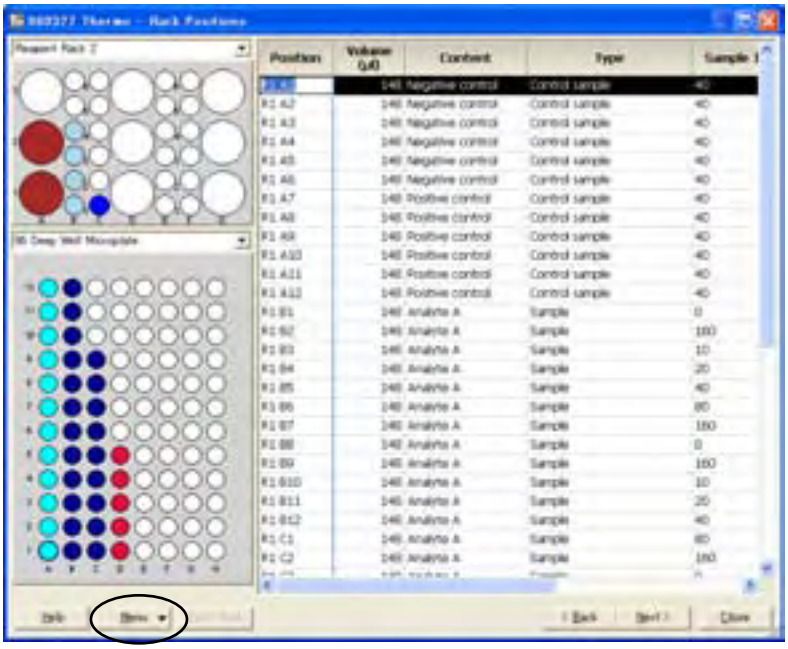
Next >をクリックします。

↓

右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

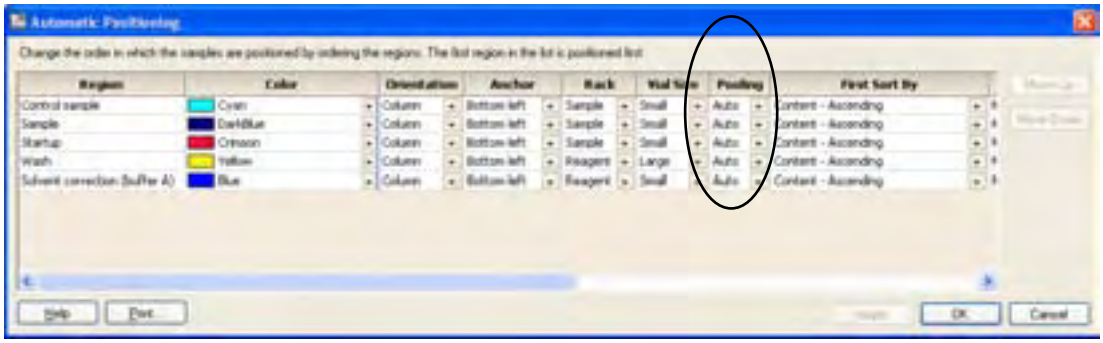
補足 5-1. 同一バイアルからのサンプリング設定

サンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分注して配置されるように組まれています（例えば同一の Control Sample であっても、R1A1 から R1A12 に 12 バイアルに分けてセットするように指示されます）。同一サンプルを同バイアルから使用したい場合はプーリング機能を利用します。



Menu から Automatic Positioning...を選択します。

↓



ここで、すべてのサンプルと試薬に関する配置を設定することができます。
“Pooling”の項目は、通常、Auto になっています。
同一バイアルからサンプリングしたいサンプル、試薬の種類について、“Pooling”のプルダウンメニューから Yes を選択し、ダイアログ右下の OK をクリックします。

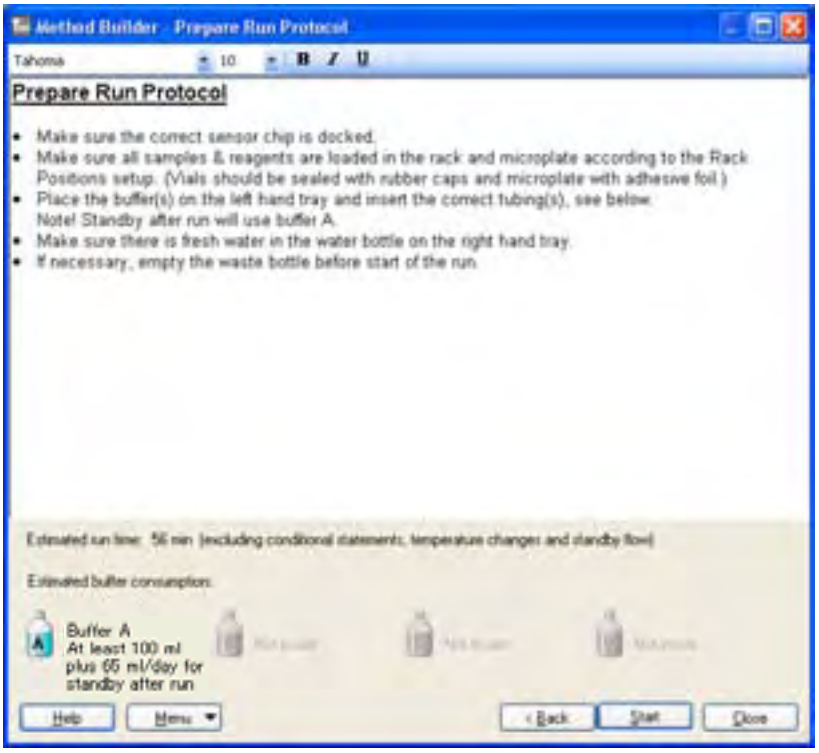
なお、Automatic Positioning ダイアログでは色やバイアルのサイズの設定もできるので、これらも必要に応じて適宜設定を変更します。

Eject Rack をクリックして、Rack tray port を開きます。

↓

ラックトレイを奥まで挿入し、OK をクリックします。
Eject Rack Tray ダイアログが閉じた後、Rack Positions ダイアログ右下の Next >をクリックします。

↓

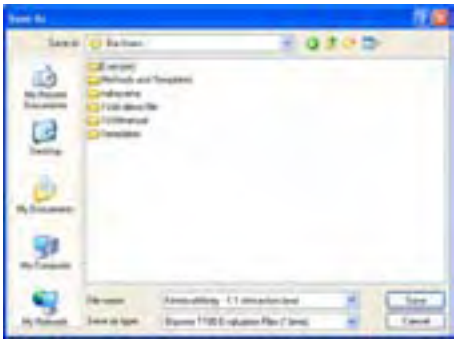

Method Builder - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 56 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Buffer A
At least 100 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。
Start をクリックします。

↓

設定したメソッドをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。
保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don't Save を選択します。

↓



Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定がスタートします。

↓

測定終了後、装置は Standby flow 状態になります。

補足 5-2. プログラムの緊急停止

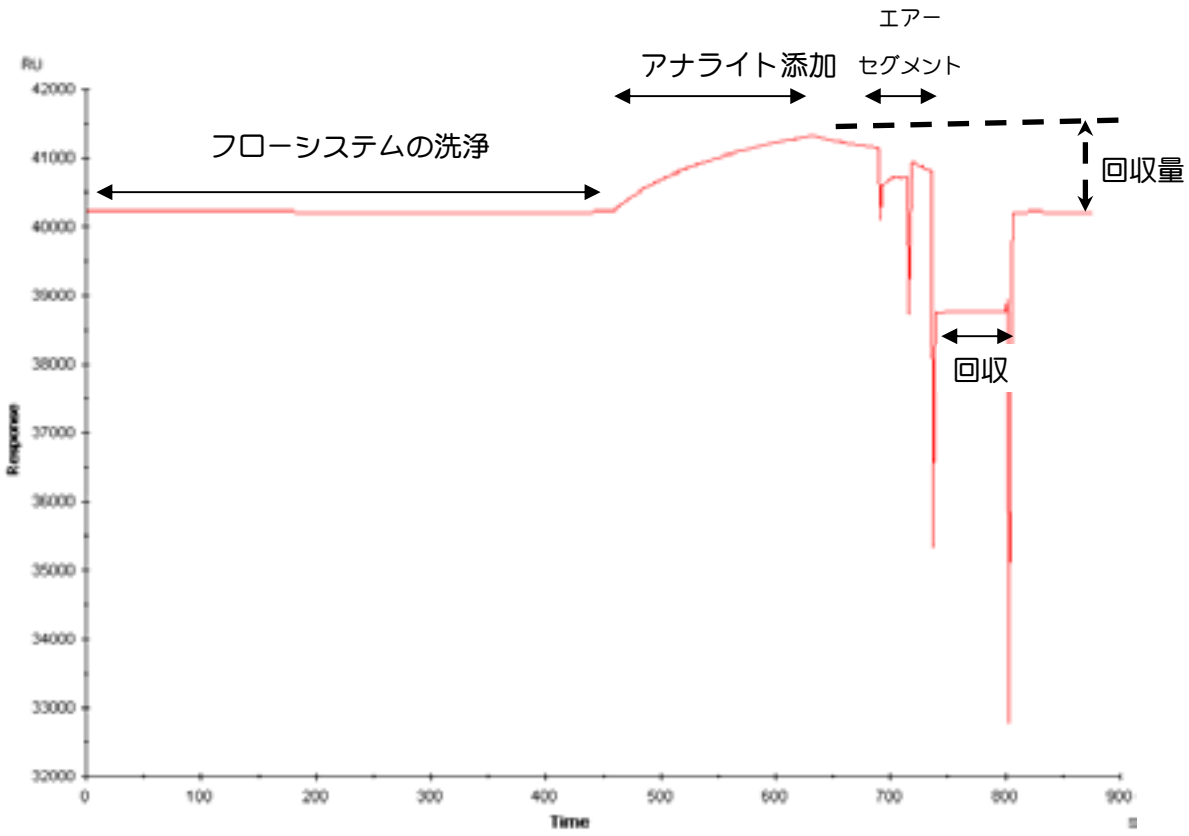
Run → Stop Run...をクリックします。

ボックス中の Stop Run をクリックします。

↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押します。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

回収のセンサーグラム



回収の評価

1,000 RU は約 1 ng/mm^2 の質量変化に相当します。

回収操作終了後 60 秒後に、結合レスポンス（bound）を相対値 0 として計算した回収レスポンス（recovered）が得られます。4 つのフローセルの面積の合計は約 5.8 mm^2 なので、何 ng 回収できたかを推測することができます。回収レスポンスは、測定結果のレポートポイントテーブルを参照してください。

Fc	Time	Window	AbsResp	SD	LRSD	Slope	RelResp	Baseline	Id
2	440.0	5	40218.2	0.53	0.60	0.00	0.0	Yes	baseline_1
2	680.0	5	41173.9	4.94	0.08	-2.64	955.7	Yes	bound_1
2	885.0	5	40108.7	238.03	199.27	84.33	-1065.2	No	recovered_1

6. 免疫原性試験

人体が異質なタンパク質にさらされると、免疫応答が起こります。慎重に設計され、構築されたタンパク質治療薬でも、異質なタンパク質としてみなされ、治療薬を認識する抗体の産生を引き起こすかもしれません。このような応答は治療効果を低下させ、場合によっては生命に係わる免疫反応を惹起します。今日、タンパク質治療薬の開発において抗薬物抗体（Anti drug Antibodies: 以下 ADAs と略します）の測定は申請の必須項目となっています。Biacore T200 を用いた ADAs の検出では、Drug-ADAs 複合体を一時的に解離した状態で測定する Merged Inject 法または Double Mix 法を使用することで、ADAs を高感度に検出できます。血中に存在する薬物の濃度や、抗体のアフィニティーに関係なく、安定的な ADAs の検出を行うことができます。さらに、免疫原性試験スキームとして、阻害法による擬陽性の確認試験、ADAs のアイソタイプの同定試験、ADAs の成熟度（結合安定性）の確認試験があります。

Merged Inject 法

Drug – ADAs 複合体を酸性化することで、ADAs を薬物から解離させた後、薬物（リガンド）を固定化したフローセルに流れる直前に、中和溶液と混合してサンプル溶液を中性化後、添加する方法です。フローセル 1 およびフローセル 2 を通る間に中和溶液と混合しますので、リガンドはフローセル 3 に固定化します。ADAs の結合速度が速く、中和後、薬物と速やかに再結合する場合は、Merged Inject 法の利用を推奨します。

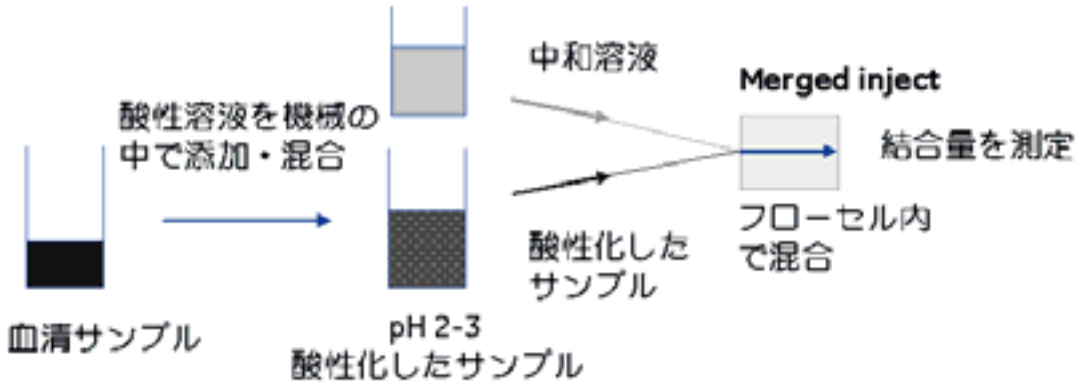


図 1. Merged Inject 法のイメージ

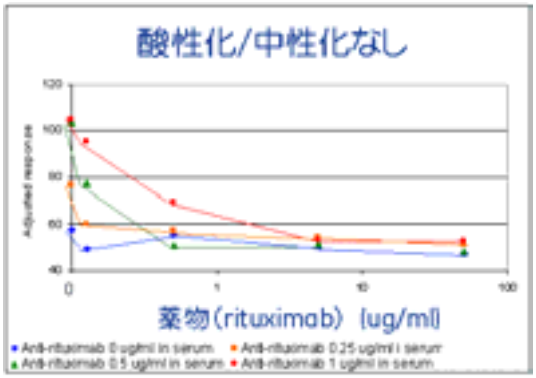


図2. サンプル中の薬物濃度変化におけるADAsの結合量の変化（酸性化/中性化なし）

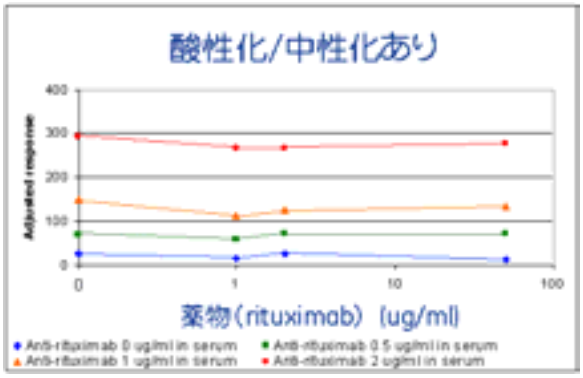


図3. サンプル中の薬物濃度変化におけるADAsの結合量の変化（酸性化/中性化あり）

Double Mix 法

Drug – ADAs 複合体をマイクロプレートのウェル内で、酸性化および中和後にフローセルに添加する方法です。ADAs の結合速度が遅く、中和後に再結合するまで時間がかかる場合や、酸性化することで薬物が破壊され、複合体形成の可能性がない場合は、Double Mix 法が利用できます。

至適条件

センサーチップ	固定化量を確保して非特異吸着を低減するため、Sensor Chip CM5 の使用を推奨します。
リガンド固定化手法	固定化量を確保するため、アミンカップリング法を推奨します。
固定化フローセル	Merged Inject 法を使用する試験では、Fc3 と 4 にリガンドを固定化してください。(Fc4 では ADAs と抗原が再結合して感度が低下することがあるため、Fc3 での評価を推奨します。)
リガンド固定化量	固定化量が多いほど検出感度が上がります。150 kDa 程度の分子量であれば、7,000 RU～15,000 RU の固定化量を目指してください。
リファレンスの差し引き	サンプル添加後の結合レスポンスおよび解離領域で評価するため、必要ありません。ただし、センサーチップ表面への非特異的吸着を低減するためのサンプル処理が必要です。
ランニング緩衝液	HBS-EP+を推奨します。

サンプルの前処理

遠心またはフィルターろ過による不溶性成分の除去が必要です。（Merged Inject 法を使用する場合には血清は希釈せずに使用します。）

非特異吸着の低減

血清サンプルは、血清中の夾雑物がセンサーチップ表面のデキストランに非特異的吸着します。非特異的吸着を低減するため、デキストラン（NSB Reducer；コード番号　BR-1006-91）をサンプル溶液に混合してください（Merged Injection 法では効果が低いため使用しません）。終濃度の目安は 1 mg/ml です。HBS-EP+ をランニング緩衝液として使用していない場合には、HBS-EP+に相当する濃度の塩（150 mM NaCl）、界面活性剤（0.05% Surfactant P20）を混合してください。

コントロールサンプル

ネガティブコントロールとして、薬物が投与されていない血清を使います。ポジティブコントロールとして、ネガティブコントロールに抗体を添加したものを使います。繰り返し測定によるリガンドの失活が起きている場合やリガンドへの非特異的吸着が起きている場合には、それらの因子についてネガティブコントロールおよびポジティブコントロールの結合量を利用して、検体の結合量を補正することができます。補正するためには、1 測定につき 4 回、コントロールの測定を実施してください。ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールは 1 種類あれば十分です。

温度設定

Merged Injection 法では、測定温度が高いと酸性化サンプルがフローセル 1 および 2 を通過する際にセンサーチップ表面に非特異的吸着が起きます。温度が低い程、センサーチップ表面に対する非特異的吸着を抑制できるため、Analysis temperature および Sample compertment temperature はいずれも 10℃を推奨します。

通常の添加および Double Mix 法を使用する測定では、Analysis temperature は 25℃Sample compertment temperature は 10℃を推奨します。

ただし、10℃で沈殿する緩衝液成分や再生溶液（例：guanidine-HCl）を使用する際には、ご注意ください。

酸性化・中和溶液

Merged Injection 法

酸性化溶液；0.12 M HCl, 0.1 % Surfactant P20
中和溶液；1.3 M Tris-HCl, 0.05 % Surfactant P20, pH 8.5
※固体の Tris-HCl **を、終濃度** 1.3 M **になるよう超純水を用いて溶解し、**4 M NaOH **を用いて** pH 8.5 **に合わせます。最後に** Surfactant P20 **を加えて調製します。使用期間は** 1 **週間です。**

Double Mix 法

酸性化溶液；0.12 M HCl, 0.1% Surfactant P20
中和溶液；1.0 M Tris-HCl, 0.05% Surfactant P20, pH 8.0
※固体の Tris-HCl **を、終濃度** 1.0 M **になるよう超純水を用いて溶解し、**4 M NaOH **を用いて** pH 8.0 **に合わせます。最後に** Surfactant P20 **を加えて調製します。使用期間は** 1 **週間です。**

再生条件

10 mM Gly-HCl pH1.5 – 2.5 **の範囲で、**30 **秒添加することで再生できることが多いです。ただし、条件検討は必須です。条件検討では、ポジティブコントロールとして使用している抗体を用いてください。この時、抗体はランニング緩衝液に希釈したものを用います。再生条件が決定できた上で、抗体をスパイクした血清を用いて、再生条件の確認を行ってください。また、測定温度により再生条件は異なるため、測定予定の温度で条件検討を行ってください。**
なお、再生溶液添加後には、20% isopropanol, 40 mM NaOH **による** Extra wash **を実施してください。血清の流路への吸着を洗浄・除去します。**

増幅試薬

ADAs **の結合レスポンスが小さく、評価しにくい場合は、**2 **次抗体など用いて、結合量を増幅させることができます。**ADAs **のアイソタイプやサブクラスなどが不明な場合は、考えられるアイソタイプやサブクラスに対する** 2 **次抗体を混合した溶液を用いてください。リガンドとして固定化している薬物が抗体であれば、軽鎖の種類に応じて抗** human IgG lambda **抗体や抗** human IgG kappa **抗体を用いることもできます。**

システムのメンテナンス

測定終了ごとに、Desorb **を実施してください。月に** 1 **度、**Desorb

and Sanitize およびシステムチェックを実施してください。

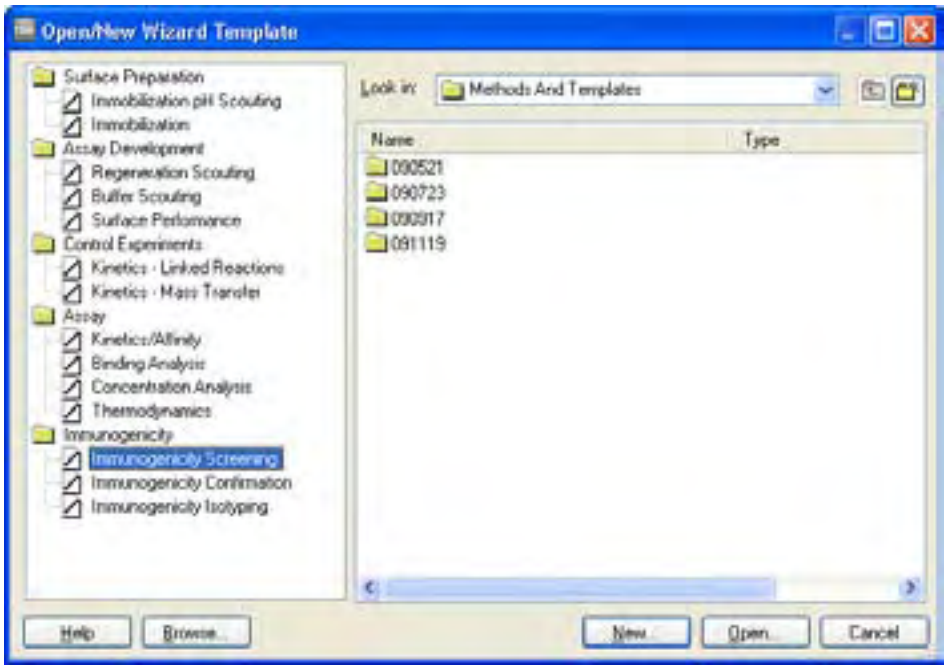
Cut-off 値の計算方法

ネガティブコントロールサンプルのレスポンスの平均値 + SD（標準偏差）x 1.645
（ネガティブコントロールとして、95 %信頼できる値として計算した場合の式となります。参照文献 Mire-Sluis, A. R. Et al 2004, J. Immunol.Methods 289, 1-16）

6-1. スクリーニング

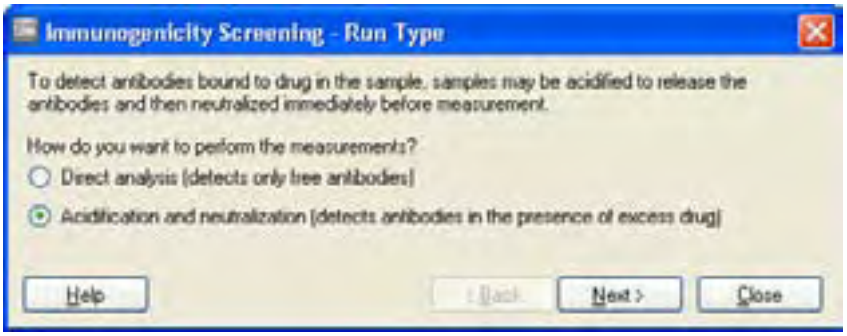
6-1-1. プログラムの実行（Merged Inject 法の場合）

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の Run → Wizard...をクリックします。



Immunogenicity → Immunogenicity Screening を選択した後、New...をクリックします。以前にプログラムを Methods and Templates フォルダに保存している場合は、右側の一覧表に反映されます。同じプログラムを実行したい場合は、Open...をクリックします。別のフォルダに保存されているプログラムを実行したい場合は、Browse...をクリックし、目的のプログラムをハイライトにして Open...をクリックします。

↓


Immunogenicity Screening - Run Type
To detect antibodies bound to drug in the sample, samples may be acidified to release the antibodies and then neutralized immediately before measurement.
How do you want to perform the measurements?
Direct analysis (detects only free antibodies)
Acidification and neutralization (detects antibodies in the presence of excess drug)
Help
< Back
Next >
Close

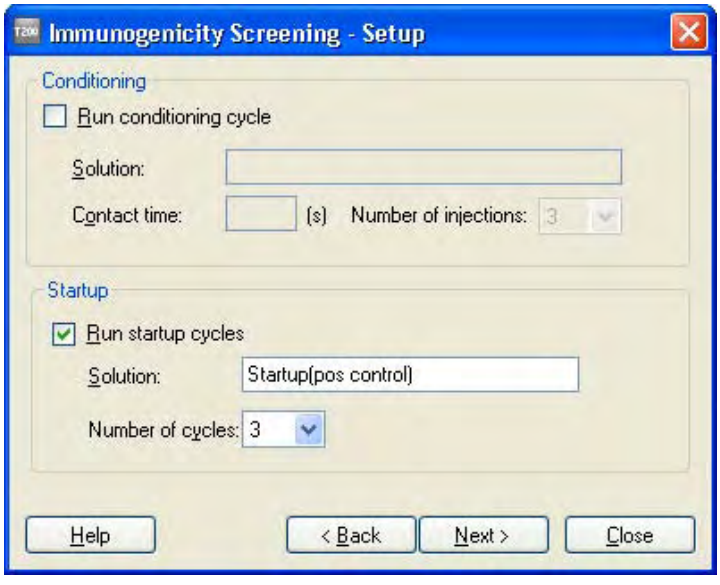
○Acidification and neutralization にチェックします。Next >をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。Enhancement および Regeneration の回数は、条件に合わせて設定します。

Next >をクリックします。

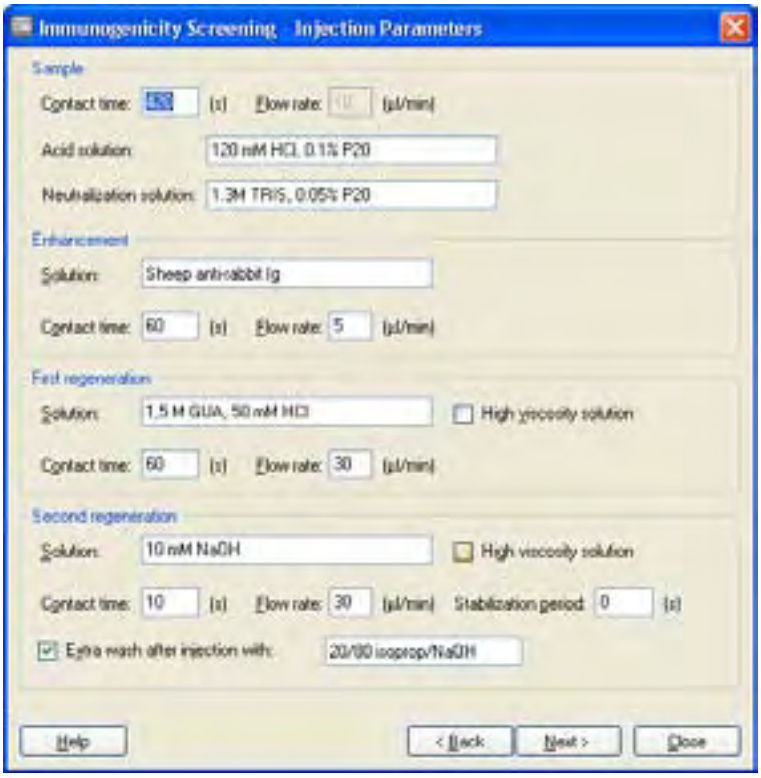
↓



ダミーランを設定します。ダミー用のサンプルは、ポジティブコントロールを用います。3 回以上の実施を推奨します。

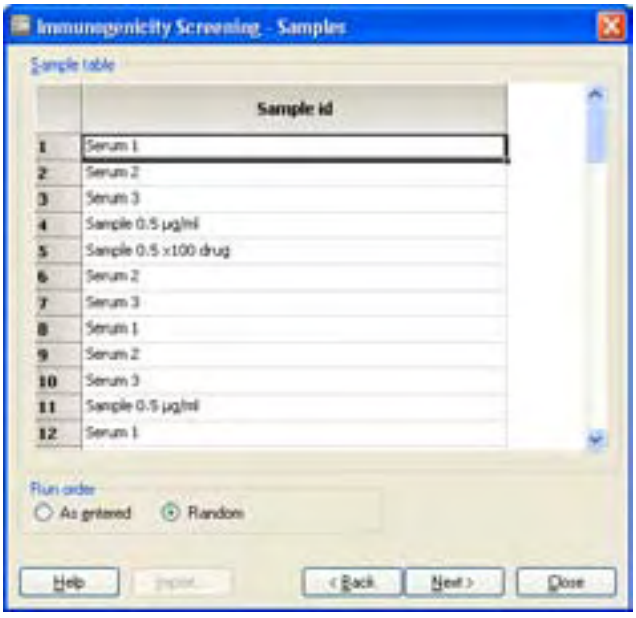
Next >をクリックします。

↓



それぞれの項目における溶液名、添加時間、流速を入力します。（上記画面は、2 次抗体の添加、2 種類の再生溶液の添加を想定した例となります。）Next >をクリックします。

↓

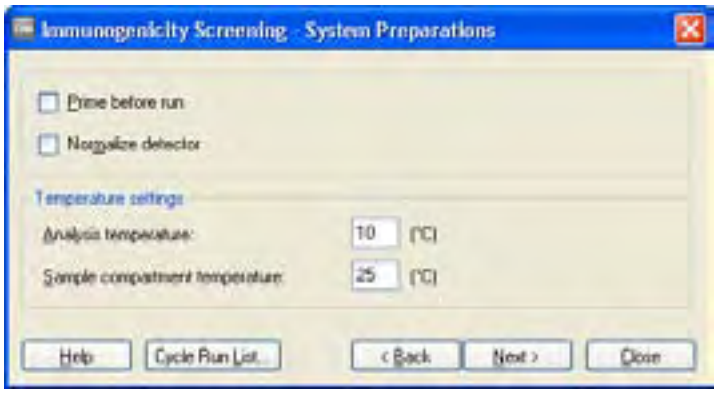


サンプル名を入力します。Cut-off 値を決めるためのネガティブコントロールサンプルは、サンプル名に blank_と入力すると、測定値を抽出するのに便利です。Run order を設定し、Next >をクリックします。

↓

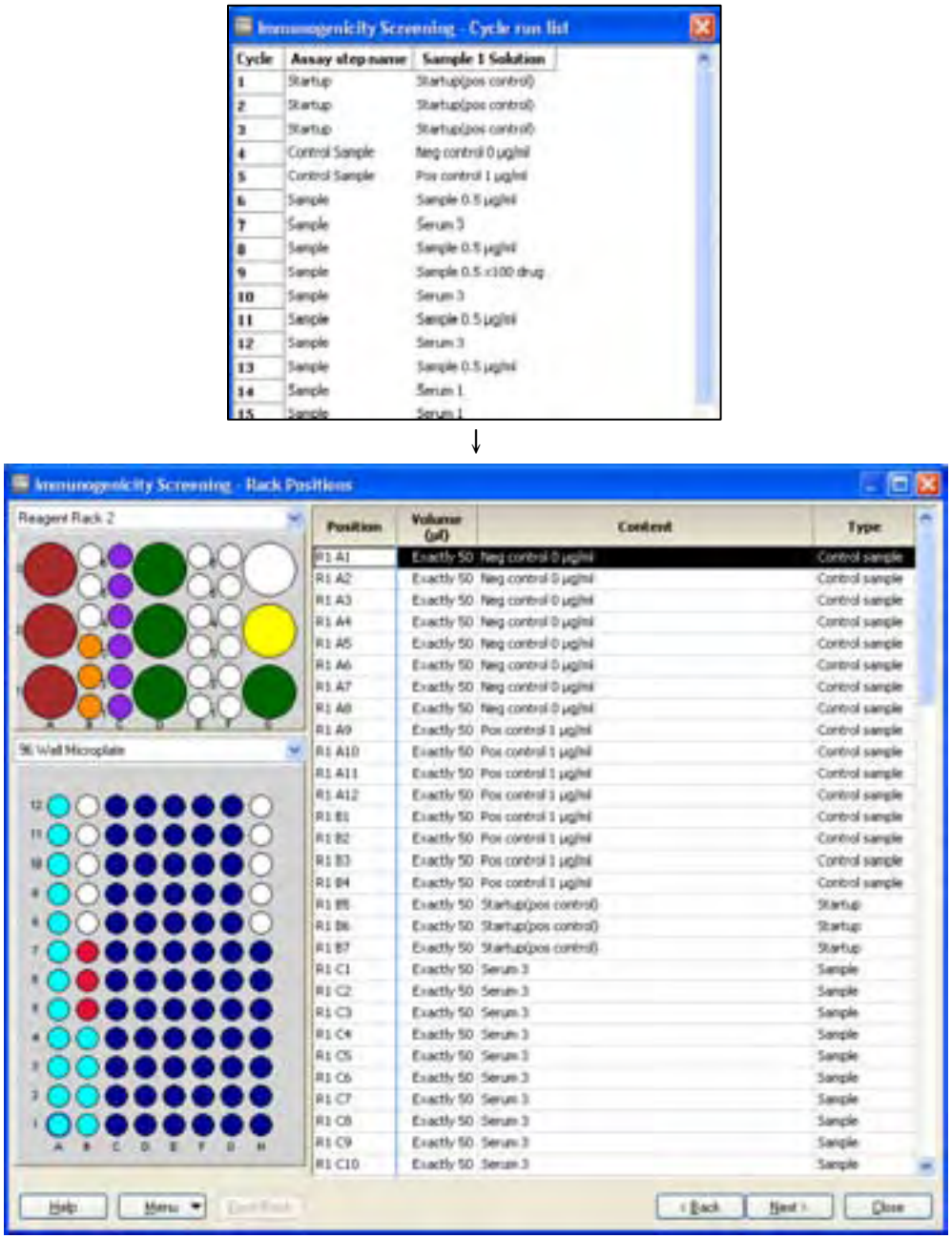
コントロールサンプルを測定する場合は、Run control samples をチェックし、さらに繰り返し測定する場合は、Run control sample(s) every をチェックします。測定頻度は、10 サンプルもしくは 20 サンプル毎が推奨です。コントロールサンプル名を入力し、Next >をクリックします。

↓



温度が低いほど非特異吸着を抑制できるため、Analysis temperature および Sample compartment temperature いずれも 10℃を推奨します。ただし、10℃にすることで沈殿する溶液もあるため、注意が必要です。（例；guanidine-HCl は 10℃で沈殿します。）最後に測定の流れを確認する場合は、Cycle Run List...をクリックします。Next >をクリックします。

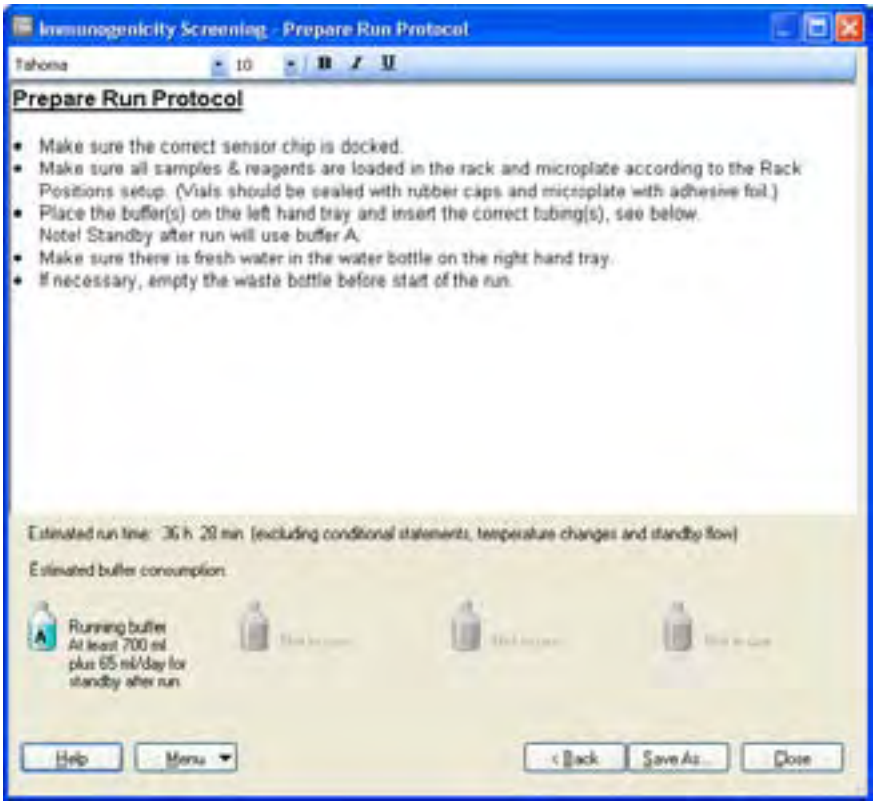
↓



右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 6-1. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import...でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。


Immunogenicity Screening - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 36 h 28 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
At least 700 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
Help
Menu
< Back
Save As...
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、Save As で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don't Save を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定がスタートします。

↓

測定終了後、装置は Standby flow 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

補足 6-2. プログラムの緊急停止

Run → Stop Run...をクリックします。

ボックス中の Stop Run をクリックします。

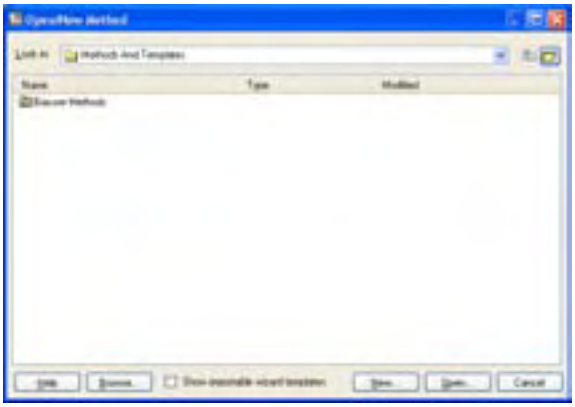
↓

実行中の測定サイクルが終了するまで待機し終了します。
上記ウインドウが開いている状態で、ただちにプログラムを終了したい場合には、画面の表示に従い、キーボードの[Ctrl]キーと[Break]キーを同時に押してください。
終了した時点までのデータが Biacore T200 Evaluation Software に移行されます。

6-1-2. プログラムの実行（Double Mix 法の場合）

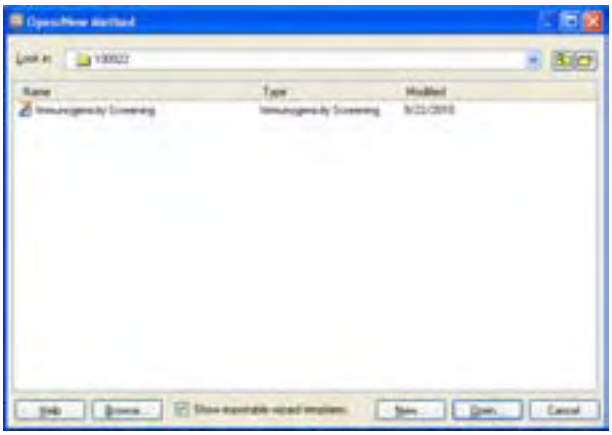
6-1-1 章に従い、Immunogenicity Screening ウィザードを用いてプログラムを作成し、保存します。保存したウィザードを用いて、メソッドによりプログラム内容を変更します。
Toolbar の Run Method アイコン（ ）または Menu bar の Run → Method...をクリックします。

↓



ウィザードを保存したフォルダを指定し、Show importable wizard templates をチェックします。

↓

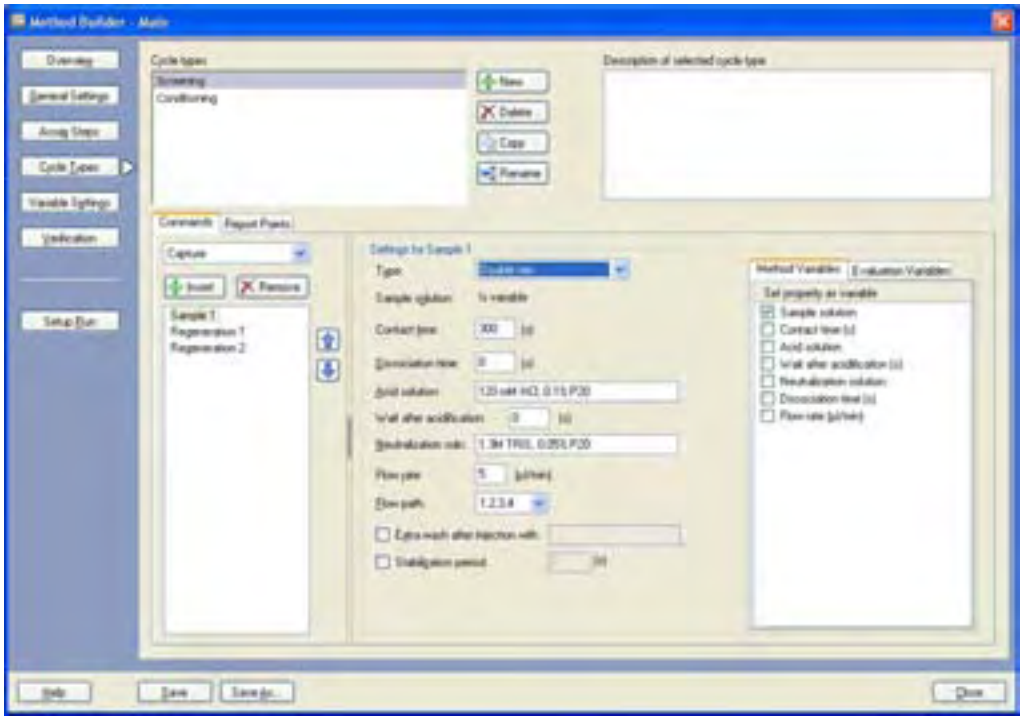


目的のプログラムをハイライトにし、Open...をクリックします。

↓

Method Builder の Main ダイアログが表示されます。
Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示されます。以下に変更項目について記載します。詳細は Biacore T200 日本語取扱説明書 -基本編-を参照してください。

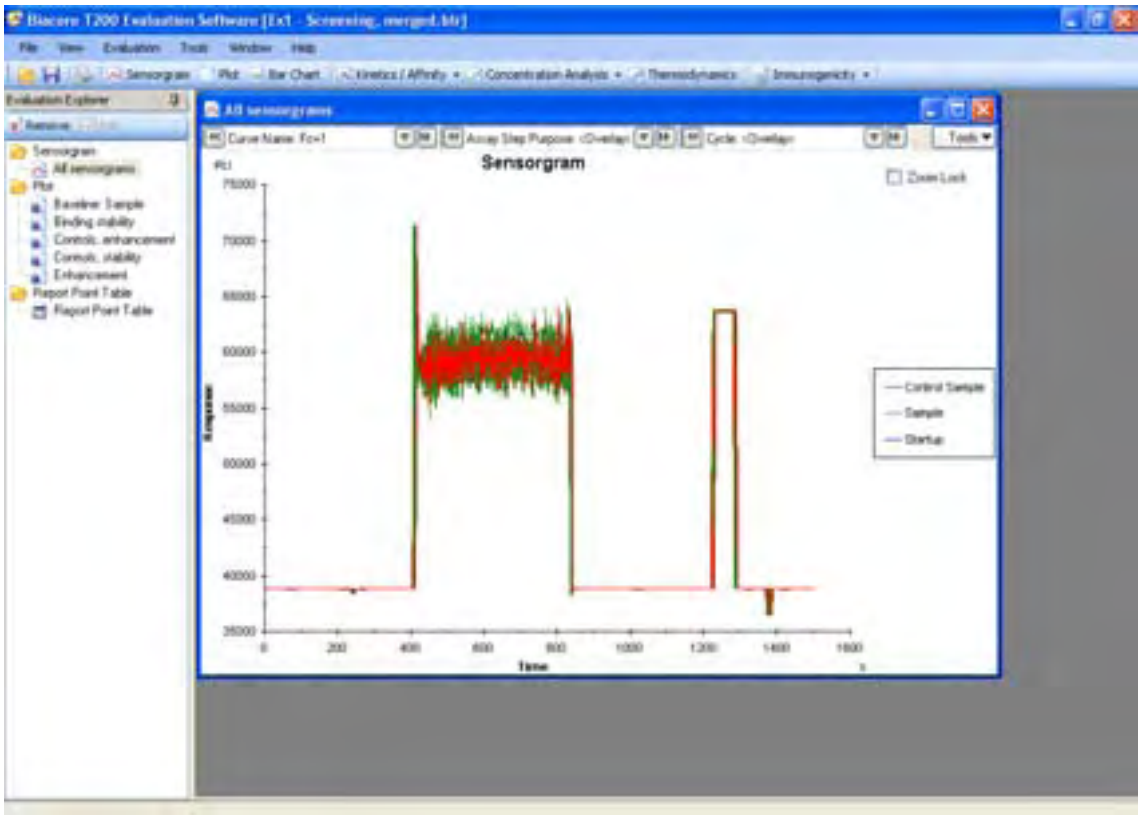
（Cycle Types）



Sample コマンドの設定を変更します。Setting for sample 1 内の Type を Double mix に変更し、Acid solution および Neutralization soln の項目に、Double mix 時の推奨条件（128 ページ）を入力します。

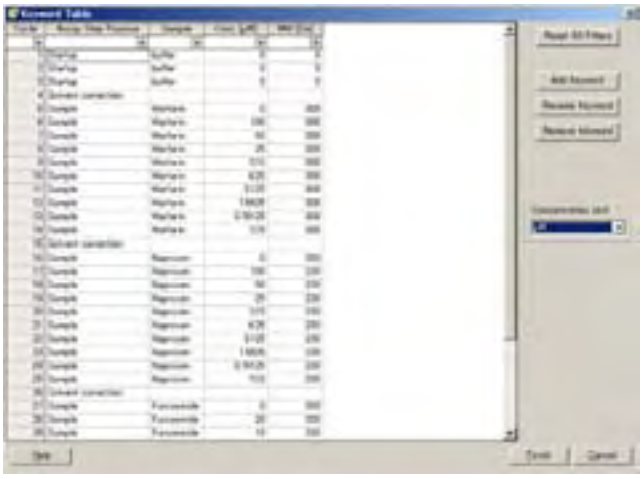
6-1-3. データ解析

ウィザードもしくはメソッドを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

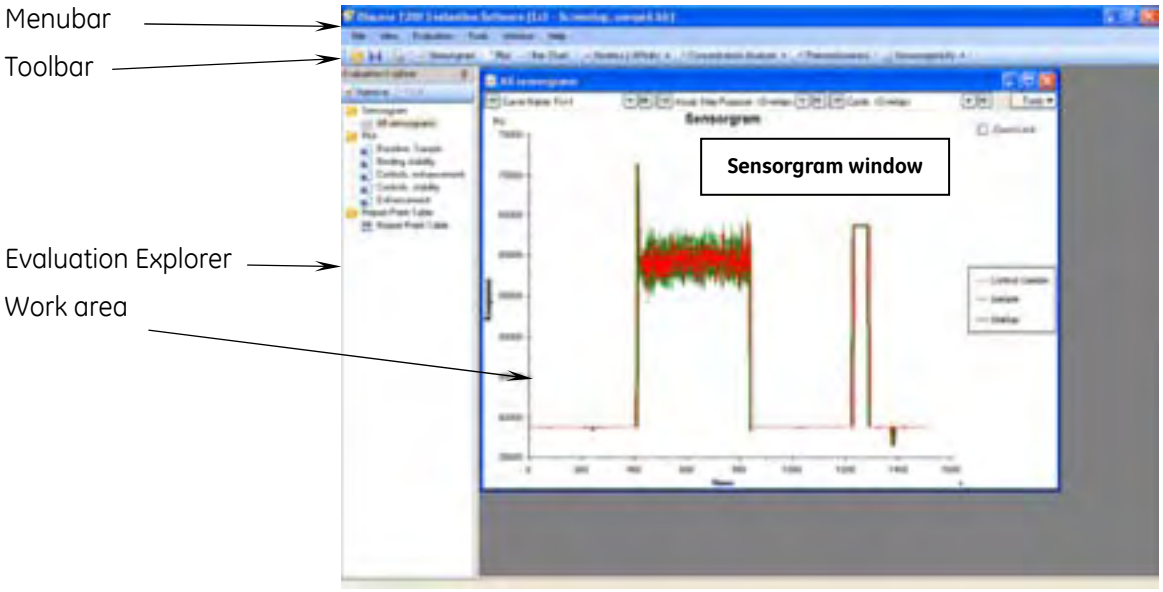


補足 6-3. サンプル情報の変更

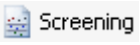
サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword Table...で変更します。Tools... → Keyword Table...をクリックします。



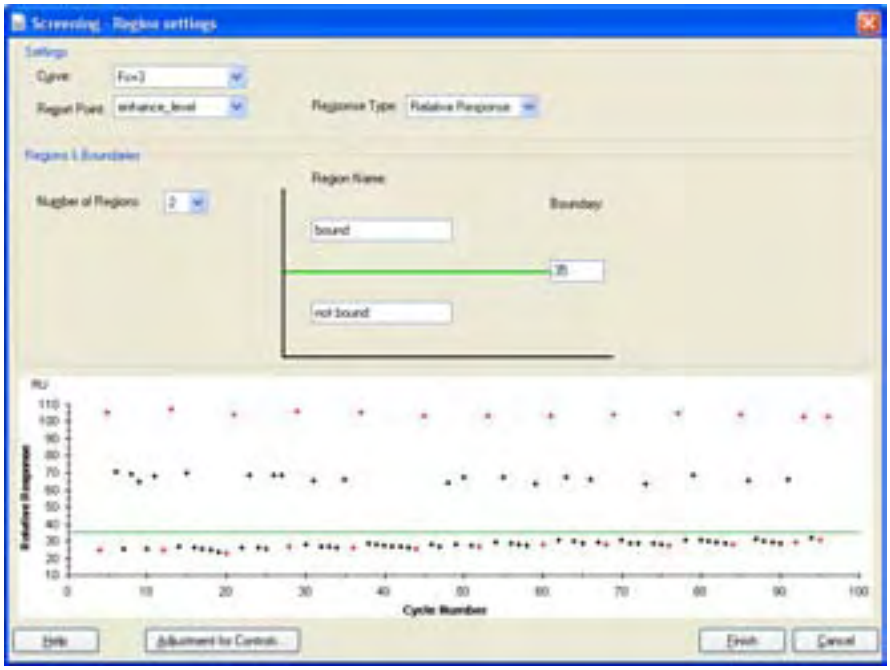
補足 6-4. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の をクリックし、  を選択します。

↓



画面下部に、サイクルごとにおける結合量がプロットされます。赤色のプロットはコントロール、黒色のプロットはサンプルです。

Settings

Curve;　Fc=3 を選択します

Report Point;　2 次抗体を利用して結合量を増幅している場合は、enhance_level
2 次抗体を使用していない場合は、stability を選択します

Regions & Boundaries

Number of Regions;　評価基準の数を設定します

Boundary;　評価基準となる数値を入力します

Region Name;　評価基準に対するカテゴリーごとの名称を入力します

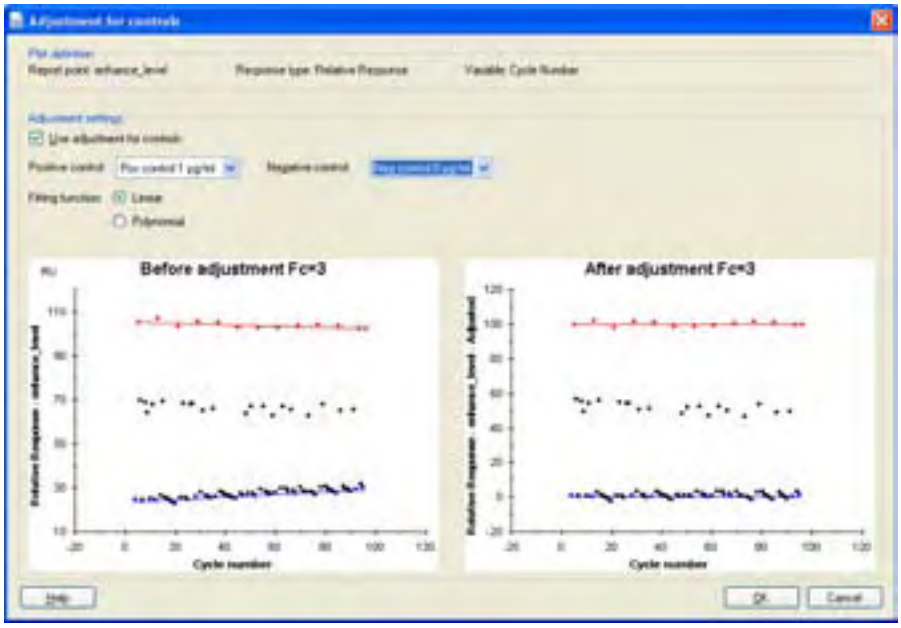
Finish をクリックします。

補足 6-5. コントロールサンプルによる結合量補正

経時的にリガンドが失活する場合や、再生条件が不十分な場合には、サイクルごとにリガンドの結合キャパシティーが低下しています。コントロールサンプルを定期的に測定している場合には、コントロールサンプルの結合量低下が確認できます。この場合、結合量のランキングを正確に把握できません。正確なランキングを行うためには、コントロールサンプルの結合量に基づき、リガンドの最大結合量を考慮し、結合量を補正します。

Adjustment for Controls...をクリックします。

↓



Adjustment settings

Use adjustment for controls にチェックします

Positive control;　利用するポジティブコントロールを選択します

Negative control;　利用するネガティブコントロールを選択します

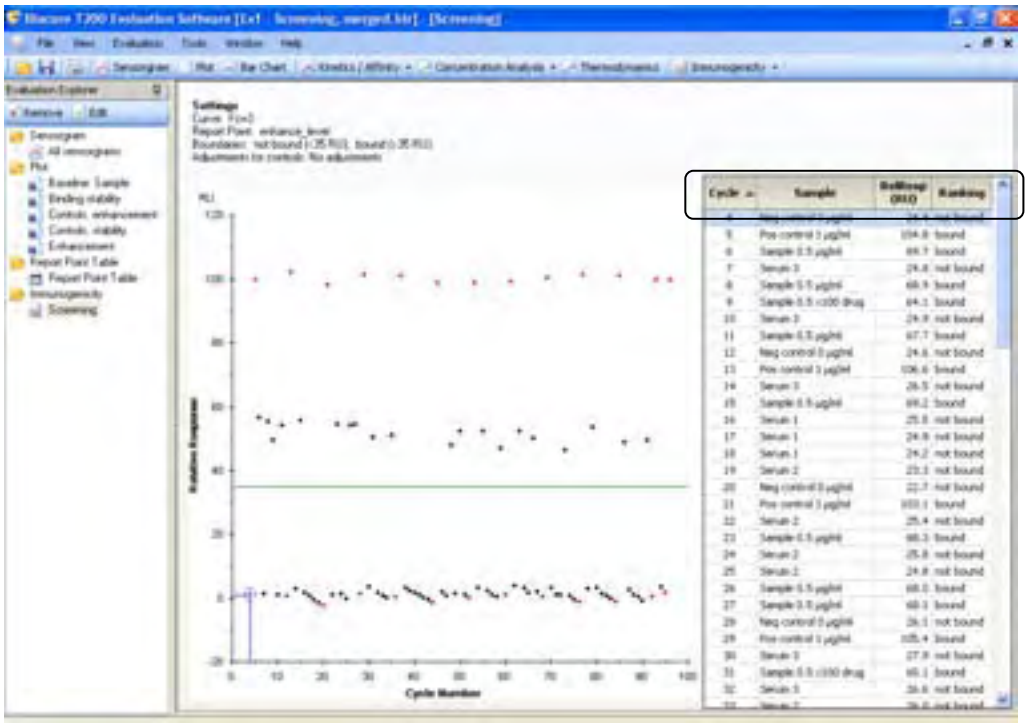
Fitting function;　フィッティングに利用する式を選択します

Linear（線形式）または Polynomial（多項式）を選択します

ウインドウ右側に補正後のプロットが表示されます。ポジティブコントロールのフィッティングラインが Y 軸=100 で、ネガティブコントロールのフィッティングラインが Y 軸=0 で表示されます。

OK をクリックすると、補正後のプロットが表示されます。

↓



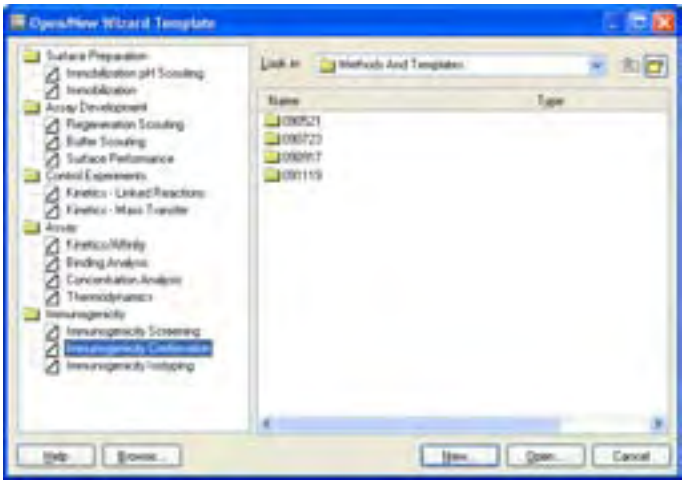
評価基準で設定した値にラインが引かれます。同時に、右表には、評価基準に対して属するカテゴリーの名称が、Ranking カラムに入力されます。上段のカラム（囲み）をクリックすると、昇順および降順の並び替えが可能です。

6-2. 阻害法を利用した ADAs の同定

スクリーニングで陽性だったサンプルについて、阻害法によって ADAs の同定をおこないます。サンプルおよびサンプルに薬物を混合した溶液を、薬物固定化表面に添加して、結合量の低下の有無から ADAs を同定します。添加はダイレクト法を使用します。

6-2-1. プログラムの実行

Toolbar の Run Wizard アイコン（ または Menu bar の Run → Wizard...をクリックします。

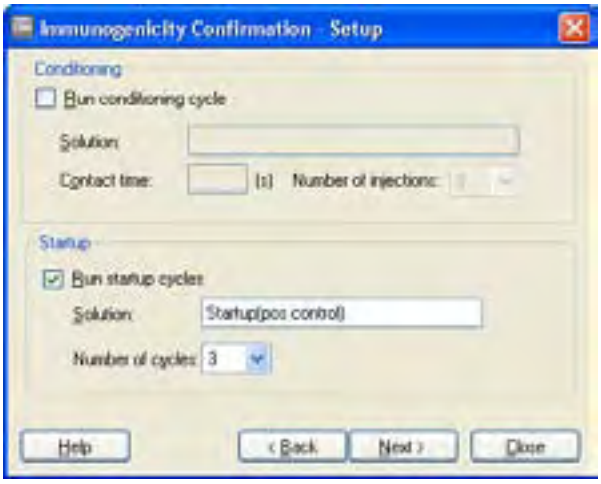


Immunogenicity → Immunogenicity Confirmation を選択した後、New...をクリックします。

↓

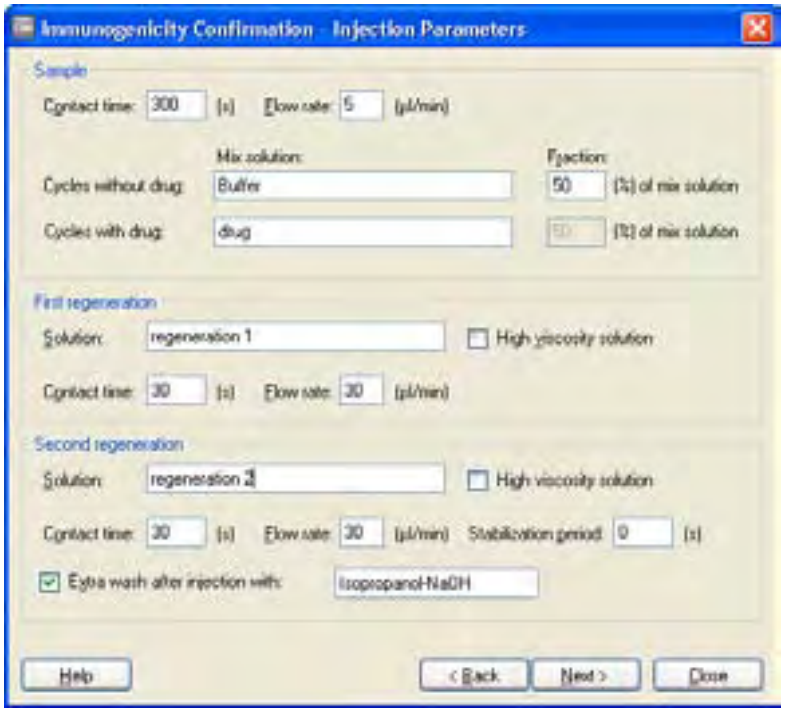
1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。Enhancement および Regeneration の回数は、条件に合わせて設定します。Next >をクリックします。

↓



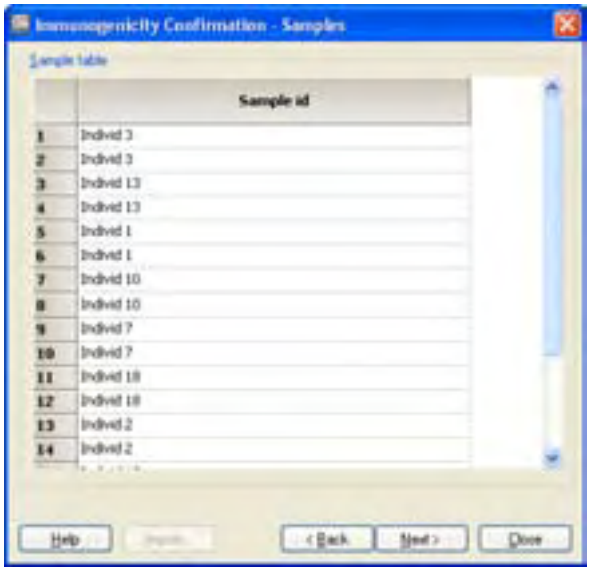
ダミーランを設定します。ダミー用のサンプルは、ポジティブコントロールを用います。3回以上の実施を推奨します。Next >をクリックします。

↓



測定直前に、サンプルに緩衝液または薬物を混合します。Sample 項目では、Cycles without drug には Buffer を、Cycles with drug には薬物名を入力します。Fraction では混合比率を入力します。サンプル添加条件および再生条件を入力し、Next>をクリックします。

↓

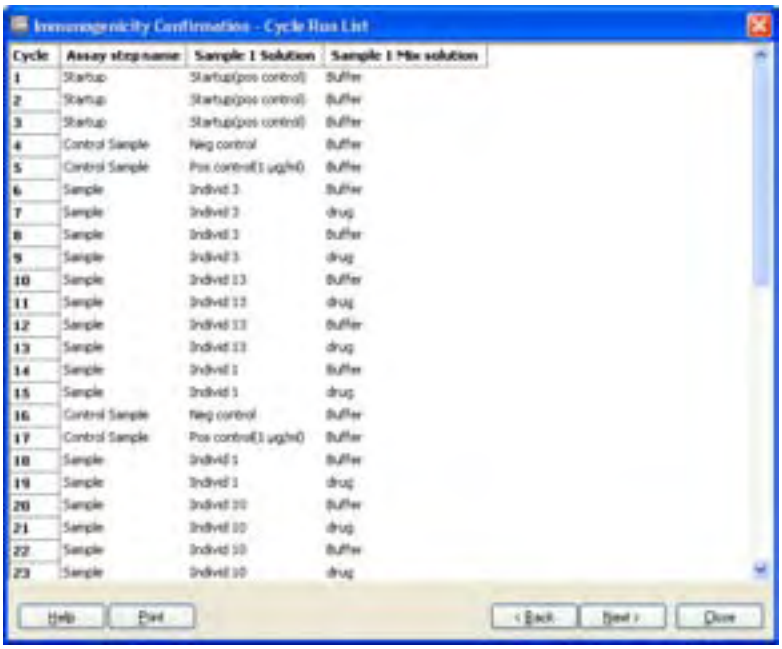


サンプル名を入力します。Next>をクリックします。

↓

コントロールサンプルを測定する場合は、Run control samples をチェックし、さらに繰り返し測定する場合は、Run control sample(s) every をチェックします。測定頻度は、10 サンプルもしくは 20 サンプル毎が推奨です。コントロールサンプル名を入力し、Next >をクリックします。

↓

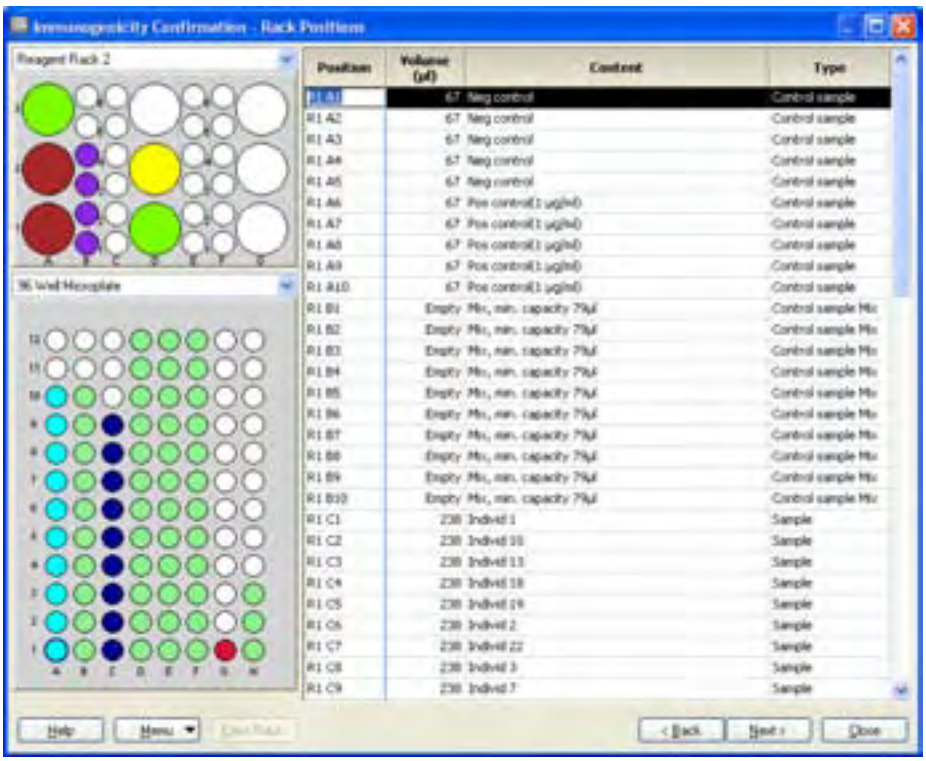


測定の流れが表示されます。Next>をクリックします。

↓

Sample compartment temperature は 10℃を推奨します。ただし、10℃にすることで沈殿する溶液もあるため、注意が必要です。（例；guanidine-HCl は 10℃で沈殿します。）
最後に測定の流れを確認する場合は、Cycle Run List...をクリックします。Next >をクリックします。

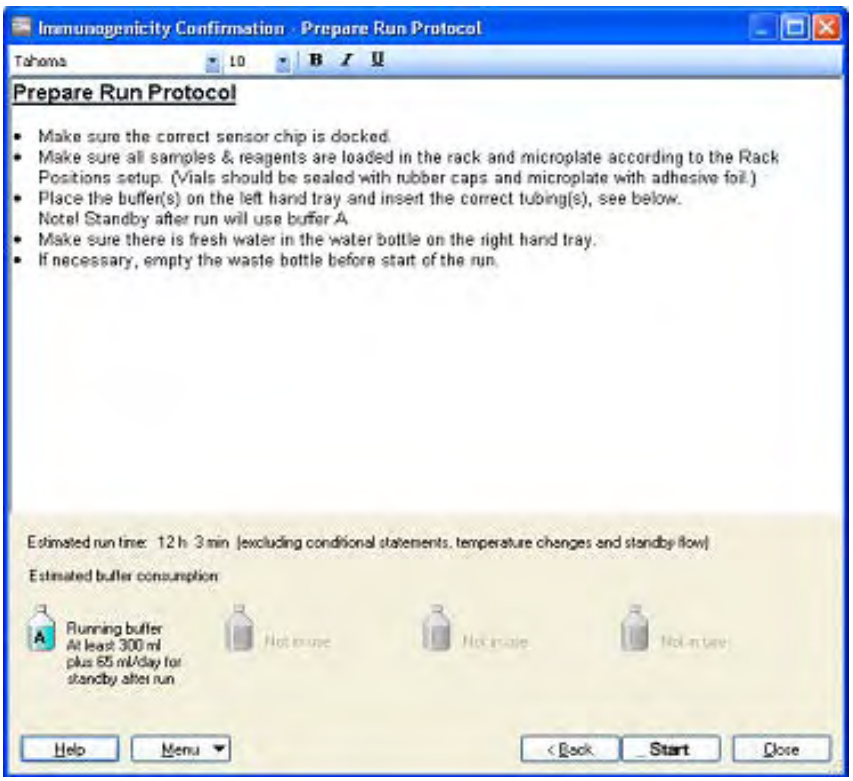
↓



右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。Next>をクリックします。

補足 6-6. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import...でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。


Immunogenicity Confirmation - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 12 h 3 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption
A
Running buffer
At least 300 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
Help
Menu
< Back
Start
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don't Save を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定がスタートします。

↓

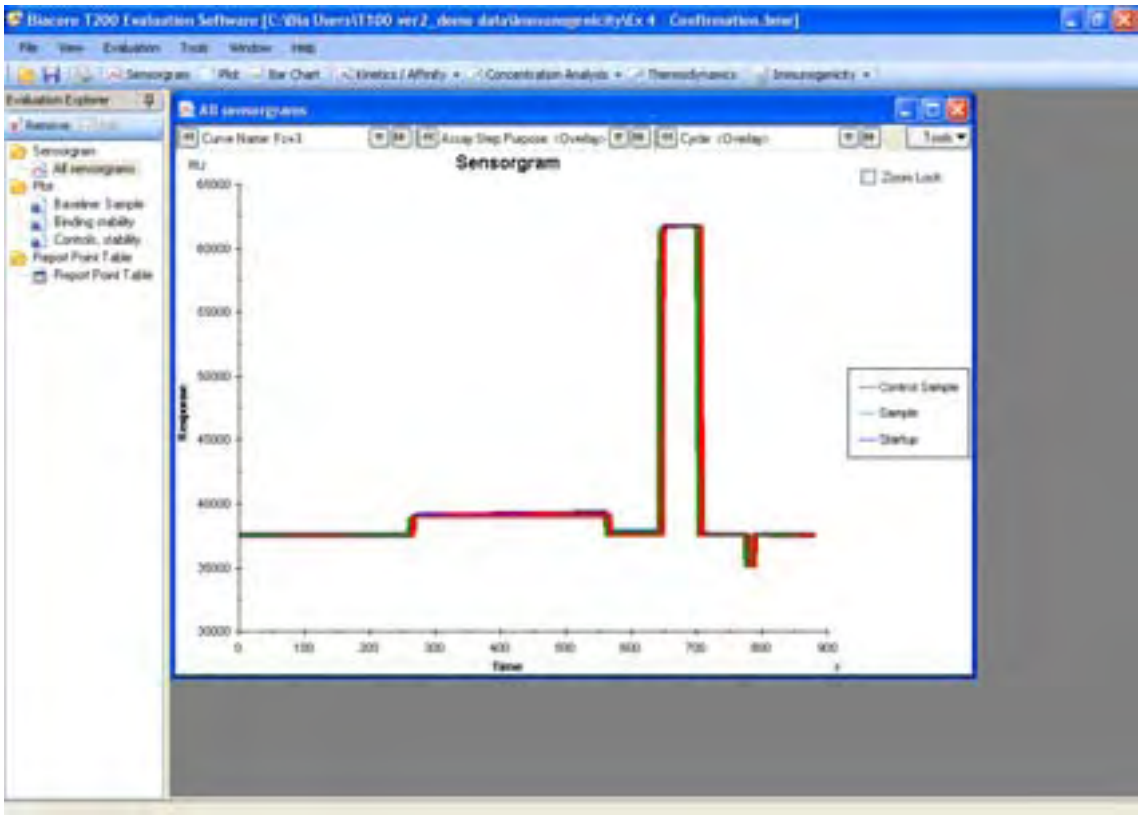
測定終了後、装置は Standby flow 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

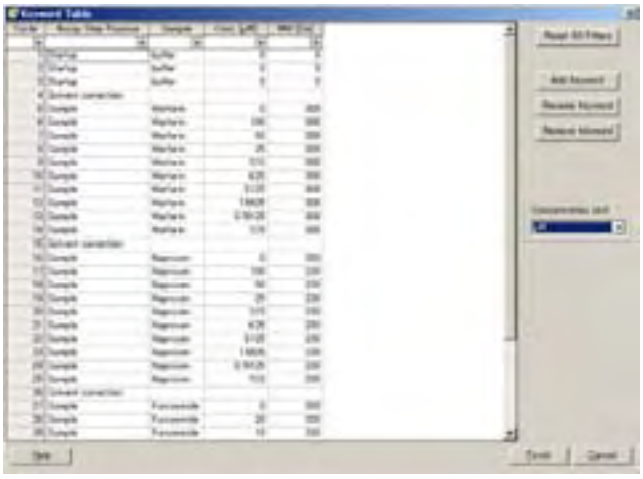
6-2-2. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

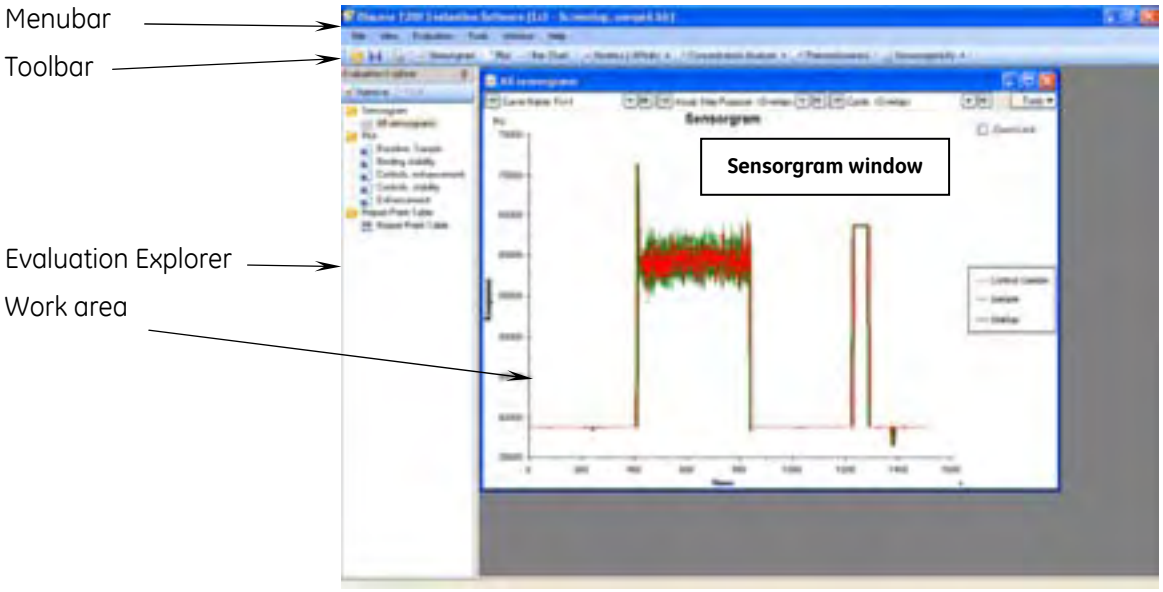


補足 6-7. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword Table...で変更します。Tools... → Keyword Table...をクリックします。



補足 6-8. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Immunogenicity をクリックし、 Confirmation を選択します。

ADAs を同定するためには、薬物を混合したときの結合量と、薬物を混合していないときの結合量を比較する必要があります。それぞれのプロットデータを作成して比較をおこないます。
上記画面では、左が薬物混合時のプロットデータ、右が薬物を混合していないときのプロットデータです。それぞれ評価基準を設けます。

Settings

Curve;	評価するフローセルを選択します
Report Point;	2 次抗体を利用して結合量を増幅している場合は、enhance_level 2 次抗体を使用していない場合は、stability を選択します

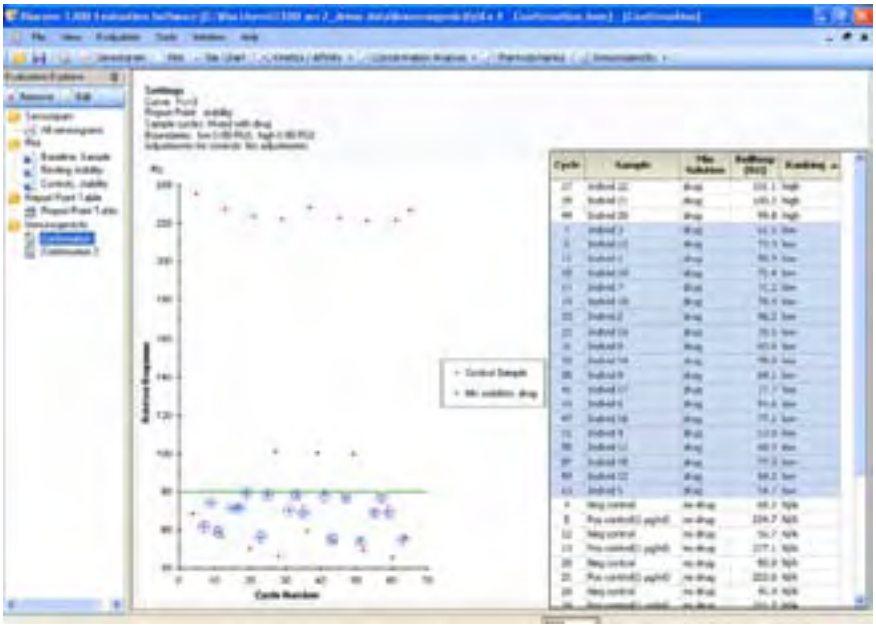
Show sample cycles mixed with;にて、薬物混合有り無しを選択します

Regions & Boundaries

Number of Regions;	評価基準の数を設定します
Boundary;	評価基準となる数値を入力します
Region Name;	評価基準に対するカテゴリーごとの名称を入力します High および low を使用すると便利です

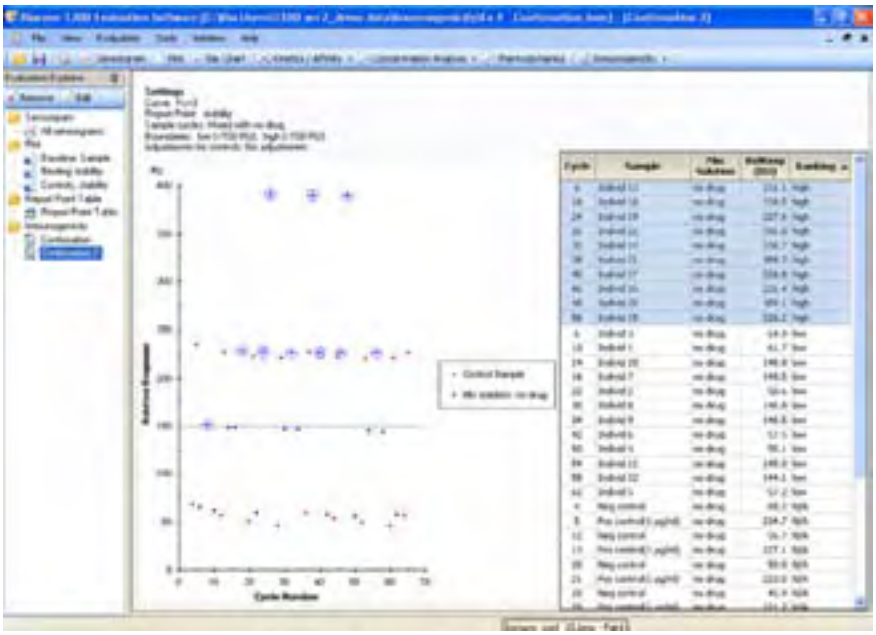
コントロールサンプルによる結合量補正については、補足 6-5 を参照してください。
Finish をクリックします。

↓



評価基準で設定した値にラインが引かれます。同時に、右表には、評価基準に対して属するカテゴリーの名称が、Ranking カラムに入力されます。上記画面は、薬物混合時の結果を表していますので、low と表示されているサンプルが、評価対象となります。
次に、薬物を混合していないときの結合量を評価します。

↓



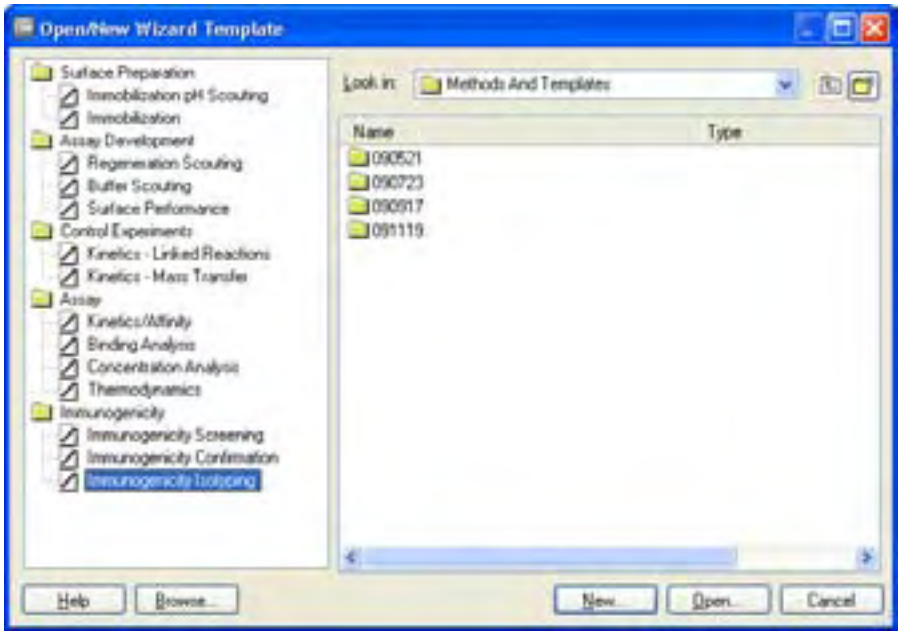
上記画面は、薬物を混合していないときの結果を表しています。high と表示されているサンプルが、評価対象となります。
薬物混合時の評価が low、薬物を混合していない時の評価が high のサンプルが、ADAs 陽性サンプルです。

6-3. ADAs のアイソタイプの同定

アイソタイプの同定は、サンプル添加後、引き続きアイソタイプを認識する抗体を添加して、結合の有無で判断します。

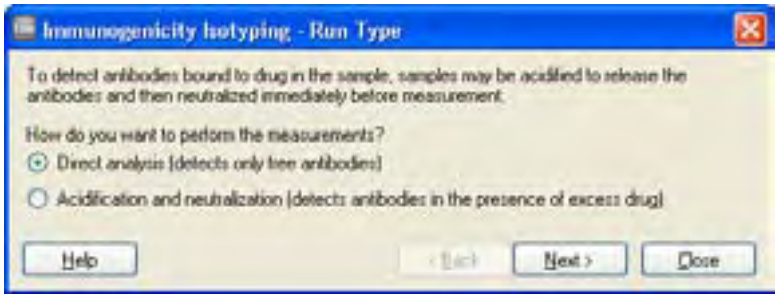
6-3-1. プログラムの実行（Merged Inject 法の場合）

Toolbar の Run Wizard アイコン（ ）または Menu bar の Run → Wizard...をクリックします。



Immunogenicity → Immunogenicity Isotyping を選択した後、New...をクリックします。

↓


Immunogenicity Isotyping - Run Type
To detect antibodies bound to drug in the sample, samples may be acidified to release the antibodies and then neutralized immediately before measurement.
How do you want to perform the measurements?
Direct analysis (detects only free antibodies)
Acidification and neutralization (detects antibodies in the presence of excess drug)
Help
< Back
Next >
Close

Merged Inject 法を使用する場合は、〇Acidification and neutralization にチェックします。酸性化および中和をしない場合は、〇Direct analysis にチェックします。Next >をクリックします。

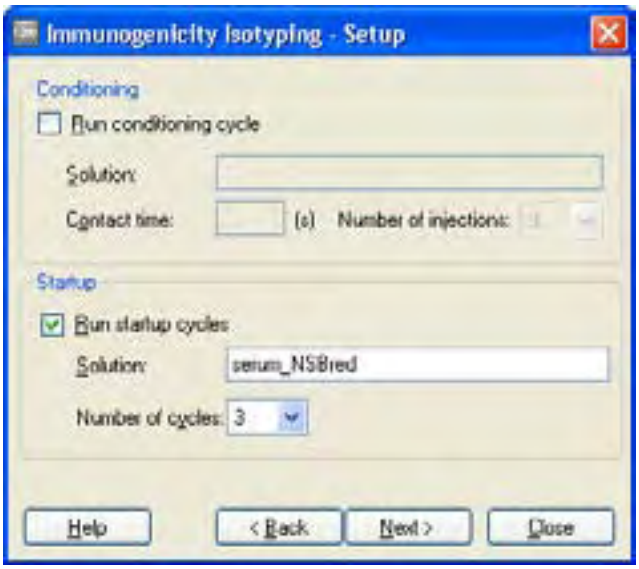
以降、〇Direct analysis を用いて説明します。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。Use reagent(s) per cycle カラムから、アイソタイプを同定するための抗体の数を選択します。Regeneration の回数は、条件に合わせて設定します。

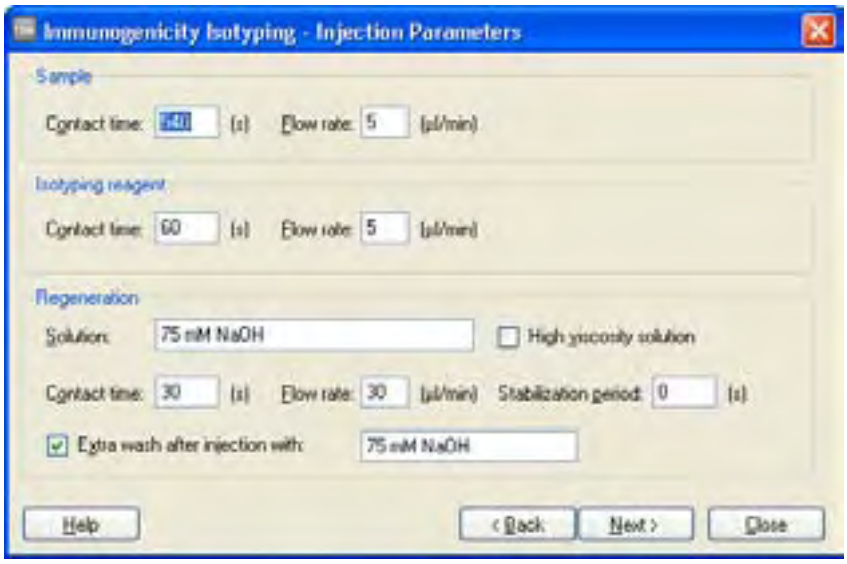
Next >をクリックします。

↓



ダミーランを設定します。3 回以上の実施を推奨します。Next >をクリックします。

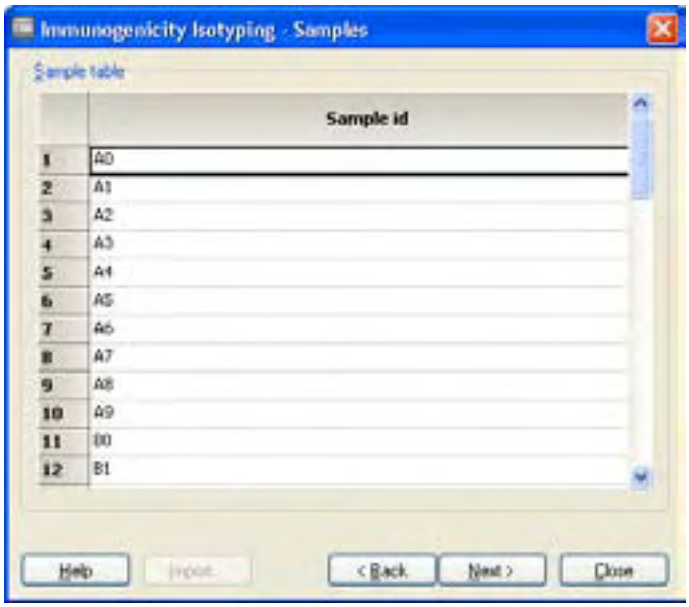
↓



それぞれの項目における溶液名、添加時間、流速を入力します。(Merged Inject 法を最初に選択している場合は、Sample 画面に、Acidification solution カラムと、Neutralization solution カラムが表示されます。)

Next >をクリックします。

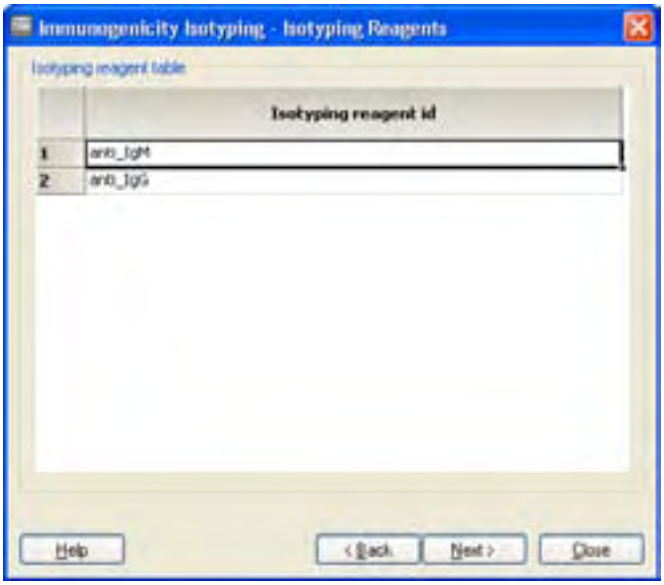
↓



サンプル名を入力します。

Next >をクリックします。

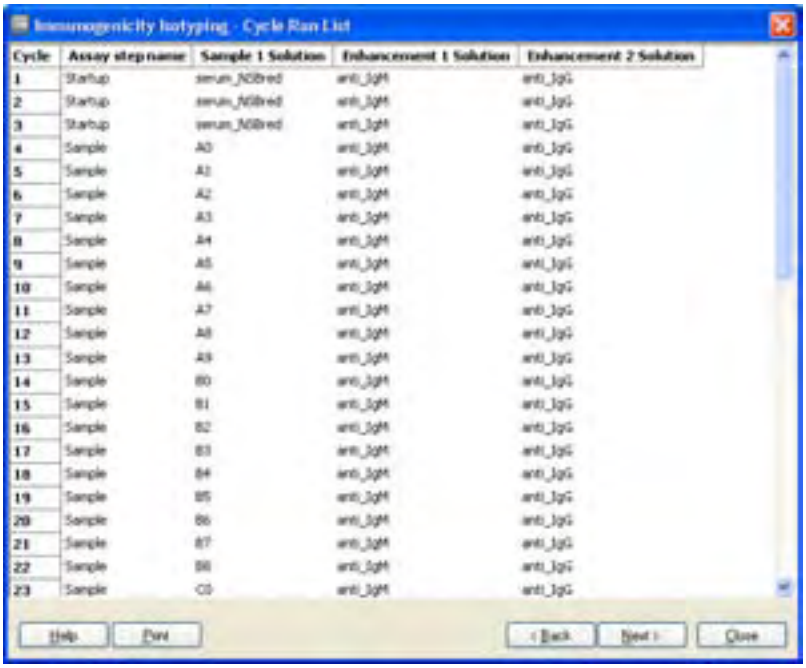
↓



アイソタイプ同定のための抗体名を入力します。

Next >をクリックします。

↓



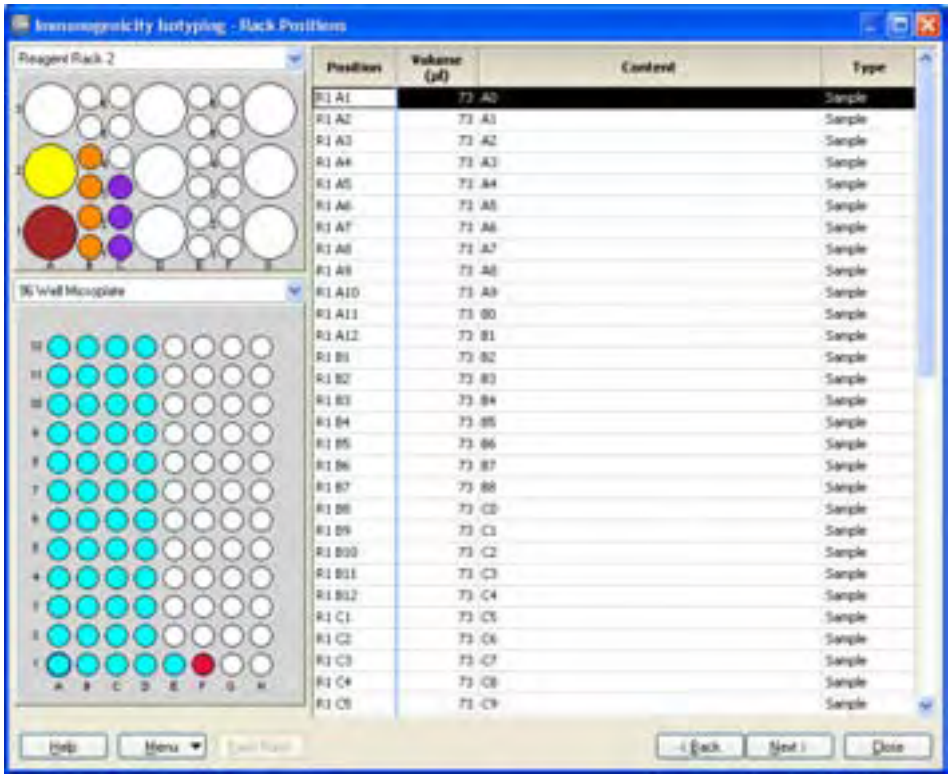
測定の流れが表示されます。

Next>をクリックします。

↓

Analysis temperature および Sample compartment temperature を設定します。Analysis temperature および Sample compartment temperature は 10℃を推奨します。ただし、10℃にすることで沈殿する溶液もあるため、注意が必要です。（例；guanidine-HCl は 10℃で沈殿します。）最後に測定の流れを確認する場合は、Cycle Run List...をクリックします。
Next >をクリックします。

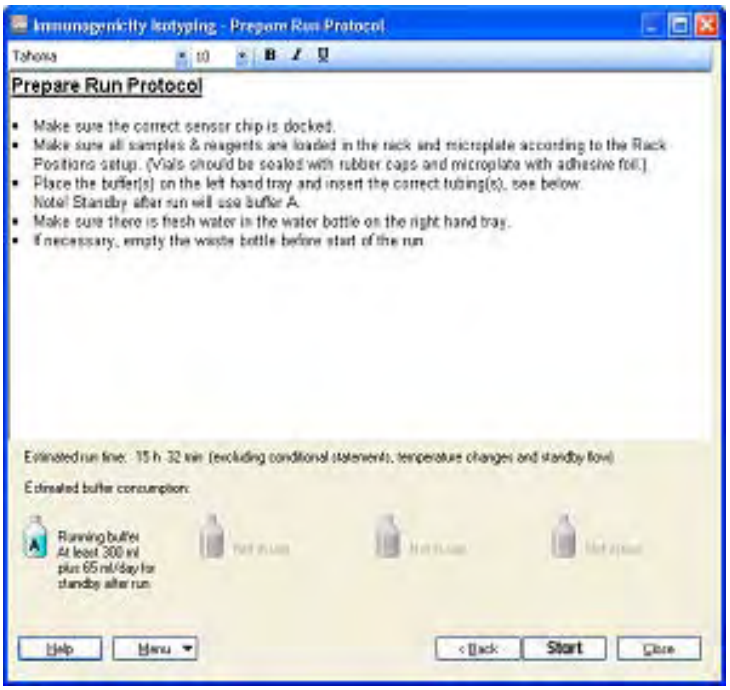
↓



右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 6-9. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import... でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。



基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don't Save を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定がスタートします。

↓

測定終了後、装置は Standby flow 状態になります。

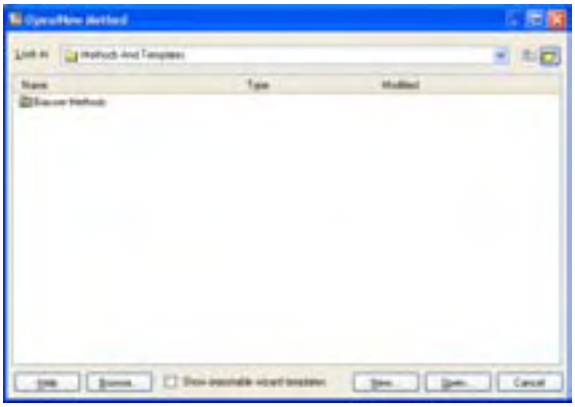
↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

6-3-2. プログラムの実行（Double Mix 法の場合）

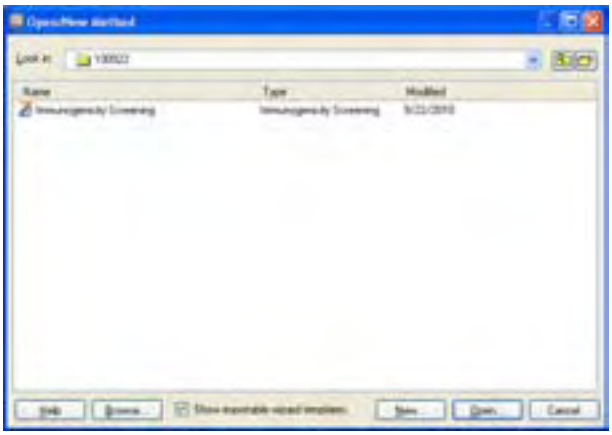
6-3-1 章に従い、Immunogenicity Isotyping ウィザードを用いてプログラムを作成し、保存します。保存したウィザードを用いて、メソッドによりプログラム内容を変更します。
Toolbar の Run Method アイコン（ ）または Menu bar の Run → Method...をクリックします。

↓



ウィザードを保存したフォルダを指定し、Show importable wizard templates をチェックします。

↓

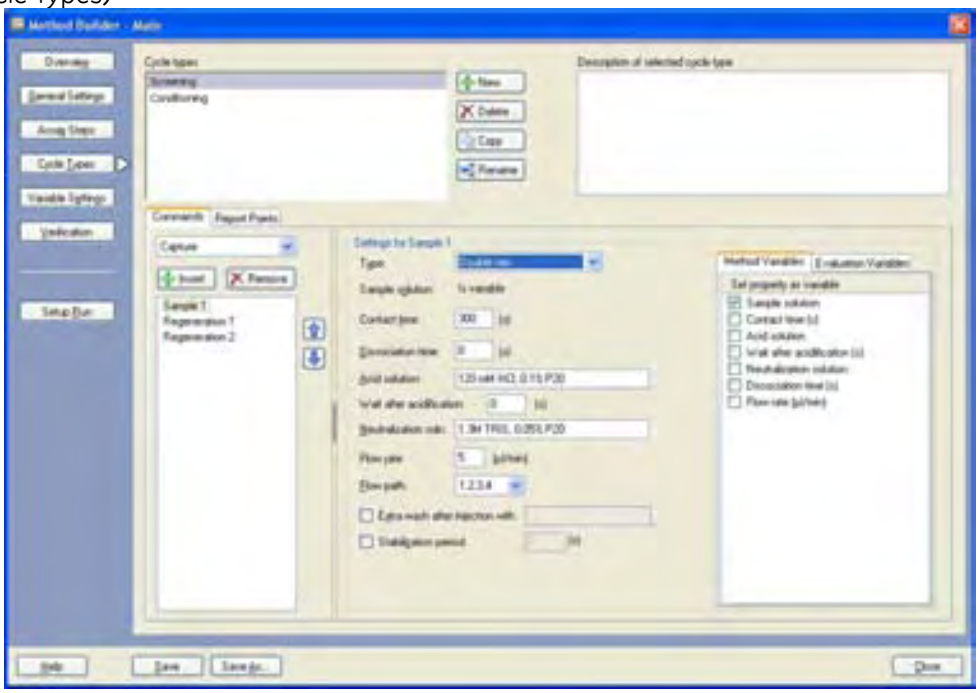


目的のプログラムをハイライトにし、Open...をクリックします。

↓

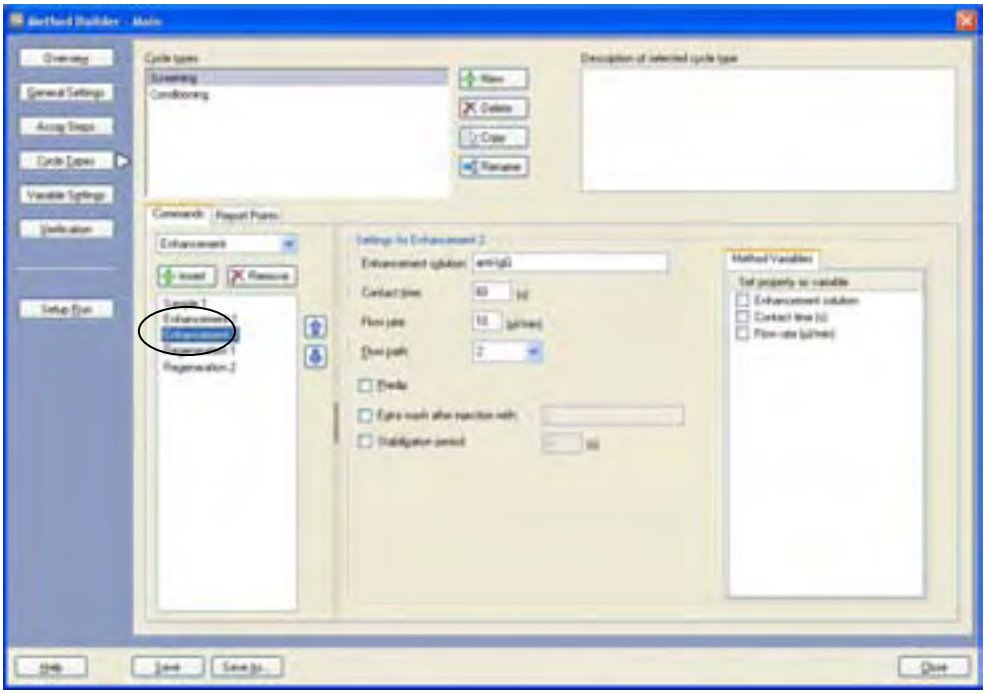
Method Builder の Main ダイアログが表示されます。
Overview 画面にはメソッド全体の設定項目が表示されます。以下に変更項目について記載します。詳細は Biacore T200 日本語取扱説明書 -基本編-を参照してください。

（Cycle Types）



Sample コマンドの設定を変更します。Settings for Sample 1 内の Type を Double mix に変更し、Acid solution および Neutralization soln の項目に Double mix 時の推奨条件（128 ページ）を入力します。

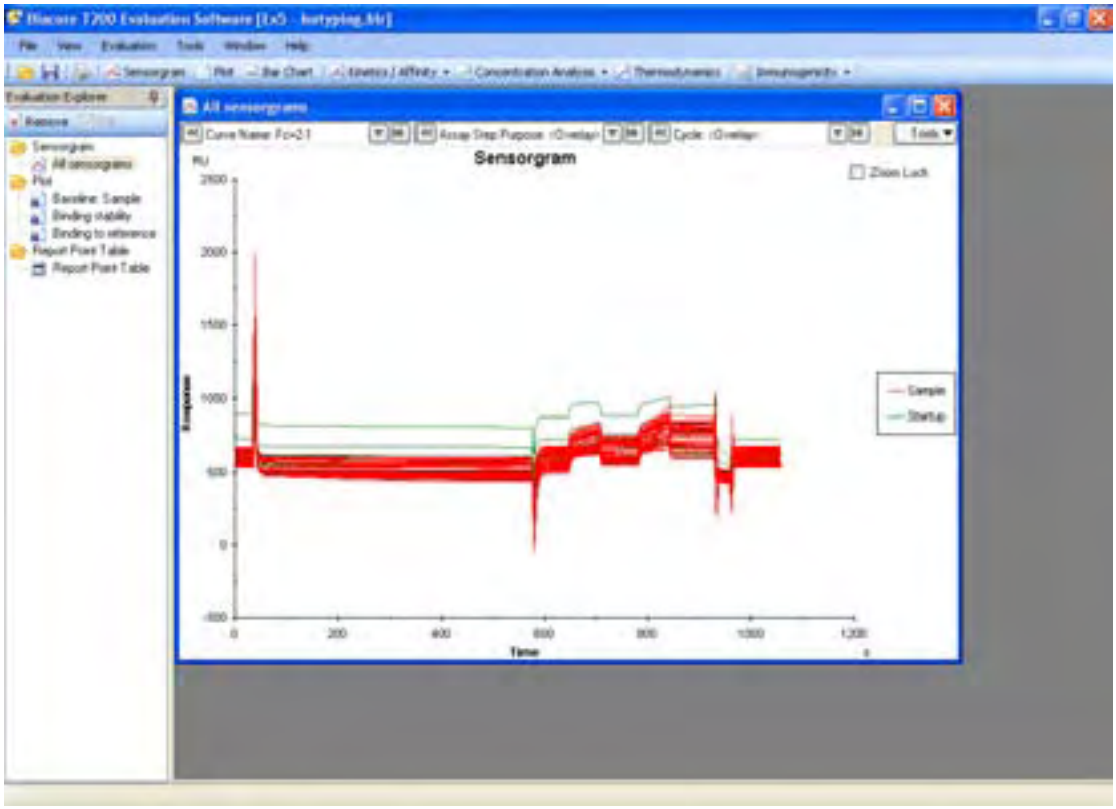
↓



2 次抗体添加のコマンドを追加します。Enhancement コマンドを 2 次抗体の数だけ追加して、詳細条件を入力してください。

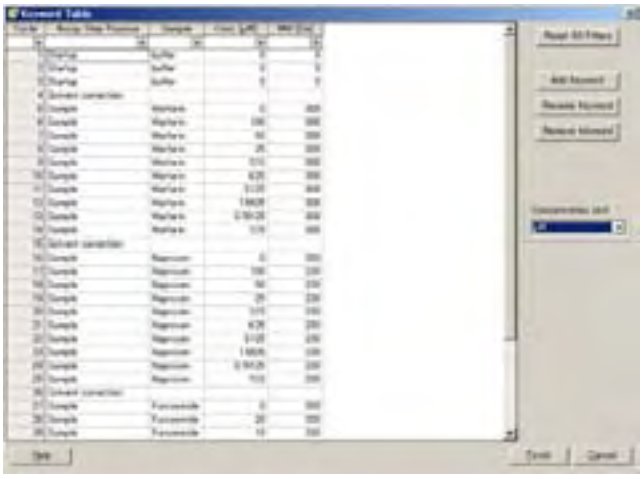
6-3-3. データ解析

ウィザードを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

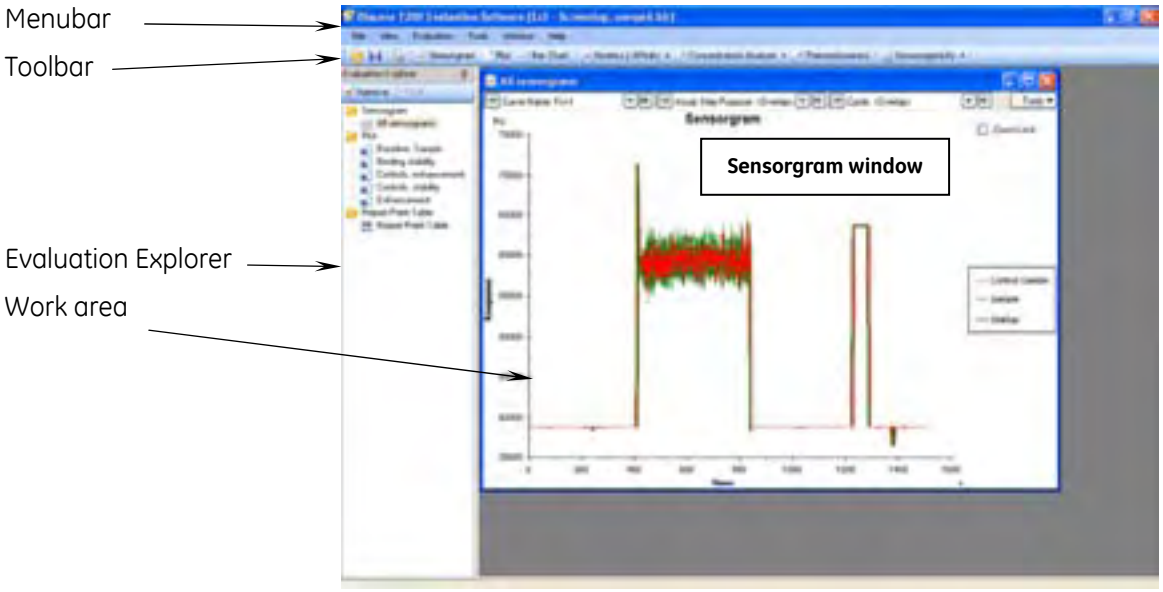


補足 6-10. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword Table...で変更します。Tools... → Keyword Table...をクリックします。

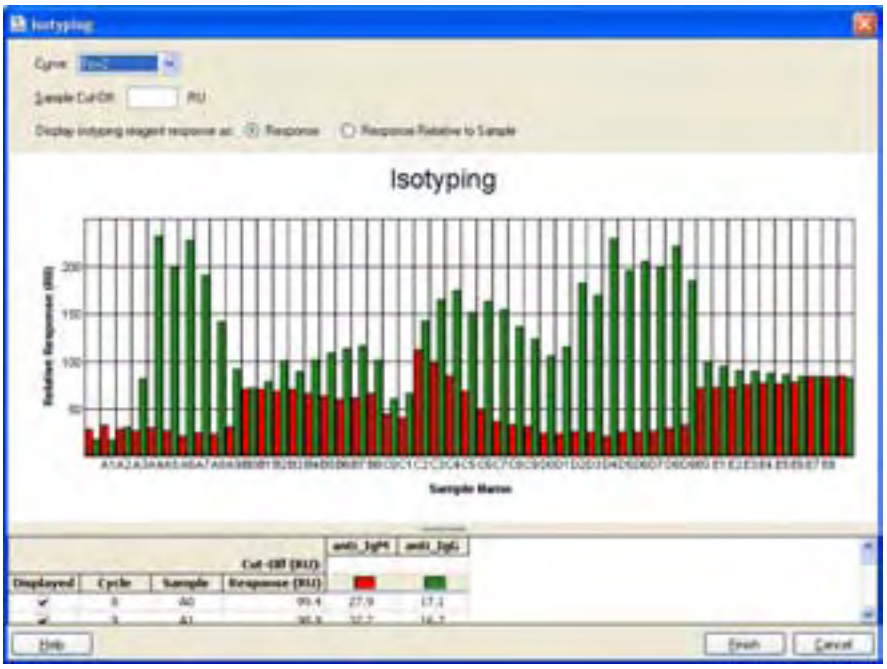


補足 6-11. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Immunogenicity をクリックし、Isotyping を選択します。

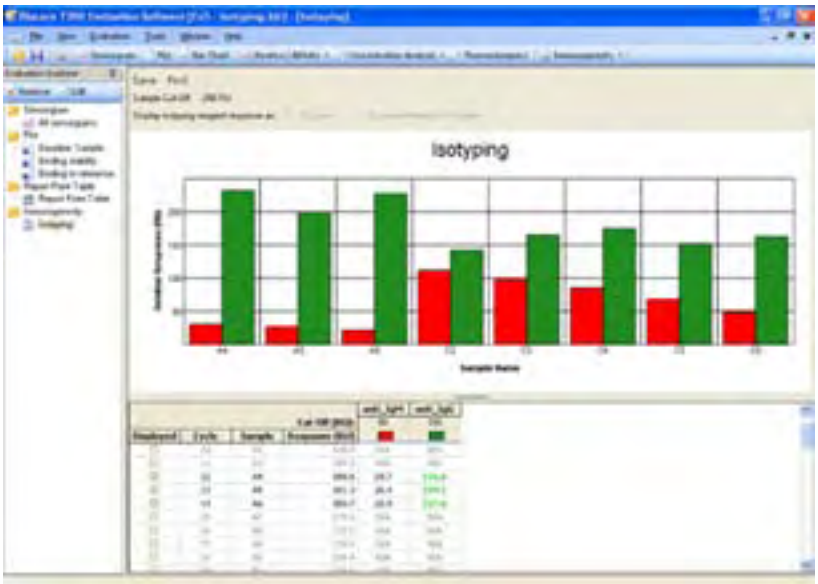


Curve;　　目的のフローセルを選択します

Sample Cut-Off;　サンプル結合量の Cut-Off 値を入力します

棒グラフは、2 次抗体の結合レスポンスを表示しています。上記画面では、抗 IgM 抗体が赤色、抗 IgG 抗体が緑色で表示されています。それぞれの結合レスポンスにおける Cut-Off 値を画面下のテーブルに入力し、Finish をクリックします。

↓



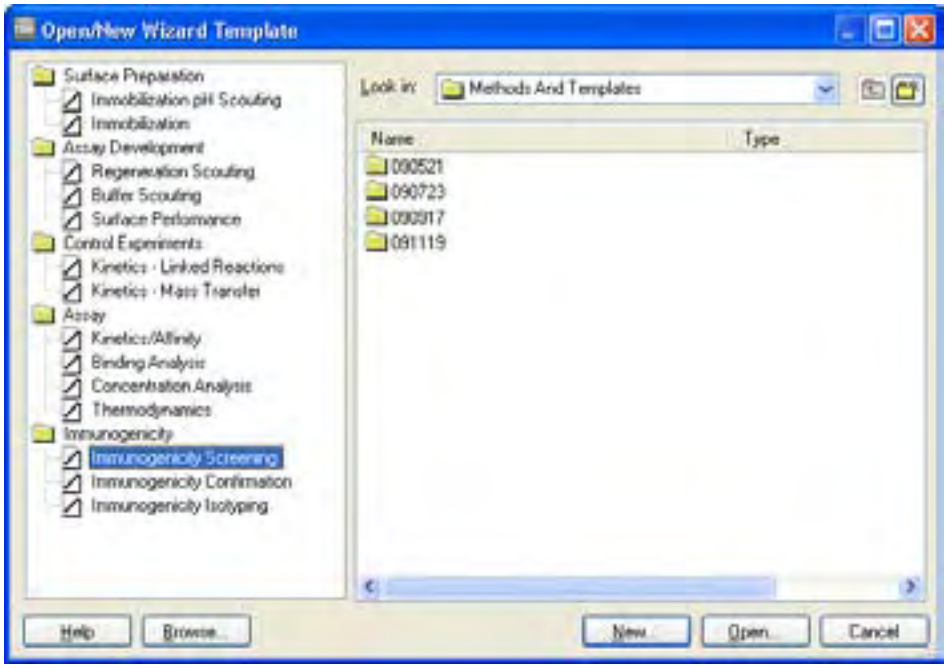
サンプル結合量が Cut-off 値を超えているサンプルが抽出されて、2 次抗体の結合量が棒グラフで表示されます。また、2 次抗体について Cut-off 値を超えている場合は、テーブルの数値が緑色で表示されます。

6-4. ADAs の成熟度の確認

一般的に、ADAs の成熟度の確認方法として、ADAs のアフィニティーを評価します。しかし、ADAs の正確なモル濃度が分からない場合は、カイネティクス解析およびアフィニティー解析は不可能です。このため、濃度情報が反映されない解離領域から、薬物に対する ADAs の結合量の半減期を算出することで、ADAs の成熟度を評価します。

6-4-1. プログラムの実行

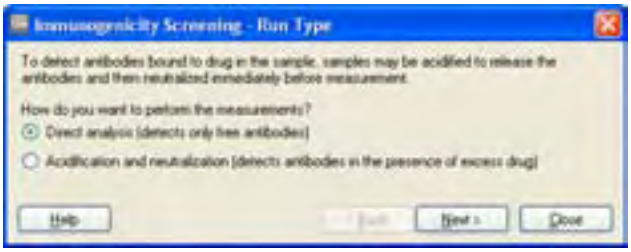
Toolbar の Run Wizard アイコン（ ） または Menu bar の Run → Wizard...をクリックします。



専用のウィザードがないため、Screening ウィザードを使用します。

Immunogenicity → Immunogenicity Screening を選択した後、New...をクリックします。

↓


Immunogenicity Screening - Run Type
To detect antibodies bound to drug in the sample, samples may be acidified to release the antibodies and then neutralized immediately before measurement.
How do you want to perform the measurements?
Direct analysis (detects only free antibodies)
Acidification and neutralization (detects antibodies in the presence of excess drug)
Help
Next >
Close

○Direct analysis にチェックします。成熟度の評価では、Merged Inject は使用しません。

Next >をクリックします。

↓

1 サイクル分の測定シークエンスを設定します。Enhancement および Regeneration の回数は、条件に合わせて設定します。Next >をクリックします。

↓

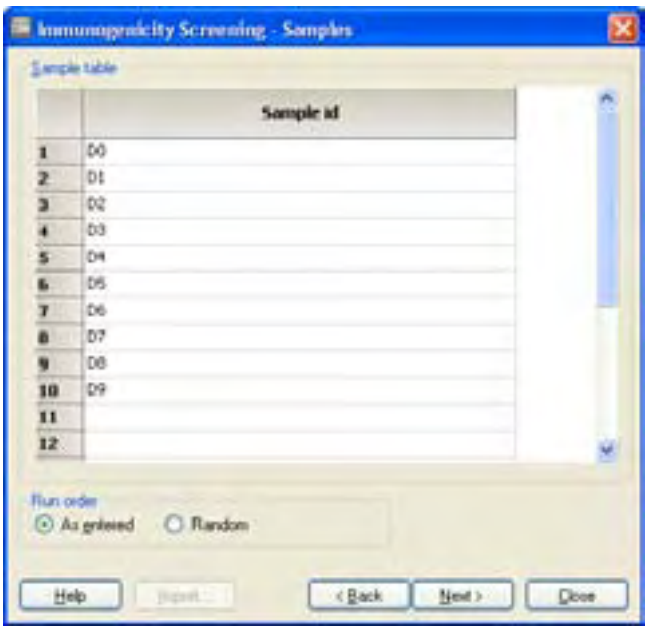
ダミーランを設定します。3 回以上の実施を推奨します。Next >をクリックします。

↓

それぞれの項目における溶液名、添加時間、流速を入力します。サンプルの解離時間は、解離領域をカーブフィッティングさせるため、120 秒以上設定してください。

Next >をクリックします。

↓



サンプル名を入力します。Run order を設定し、Next >をクリックします。

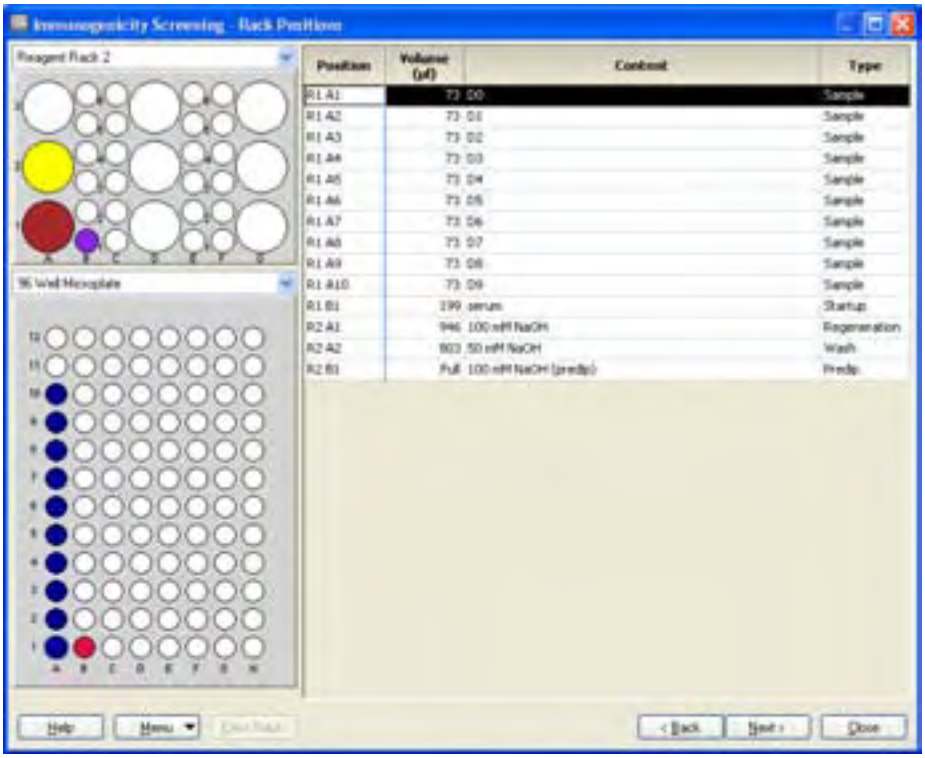
↓

コントロールサンプルを測定する場合は、Run control samples をチェックし、さらに繰り返し測定する場合は、Run control sample(s) every をチェックします。
Next >をクリックします。

↓

Analysis temperature および Sample compartment temperature の温度を設定します。Sample compartment temperature の温度は 10℃を推奨しますが、10℃で沈殿する溶液もあるため、注意が必要です。（例；guanidine-HCl は 10℃で沈殿します。）最後に測定の流れを確認する場合は、Cycle Run List...をクリックします。
Next >をクリックします。

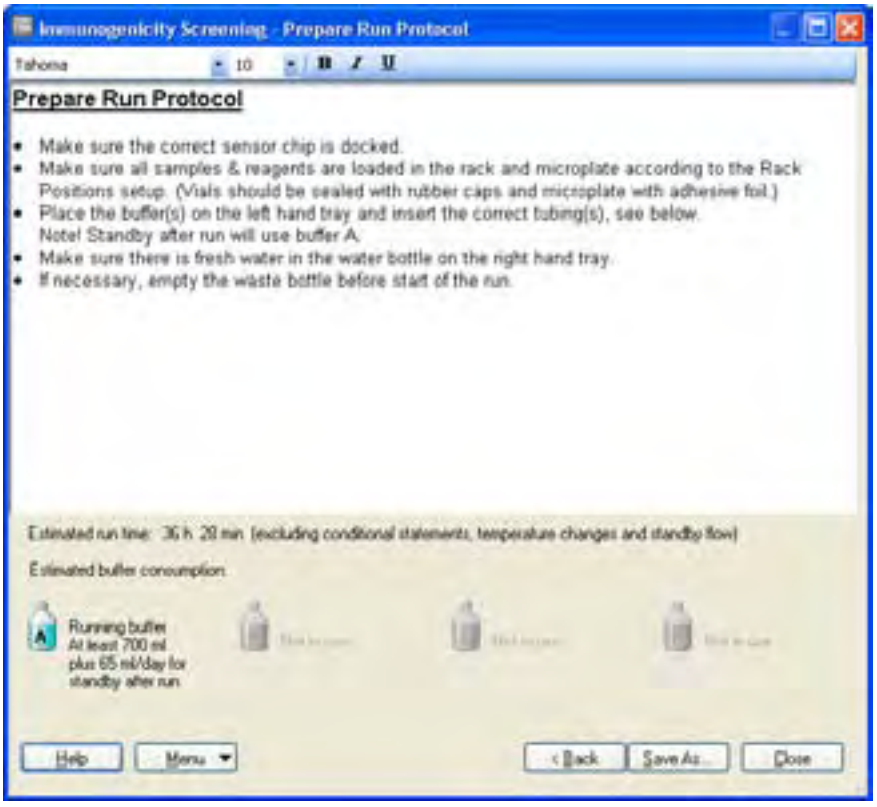
↓



右側の表でサンプルの位置とサンプル量（µl）を確認します。表中のサンプルをクリックするとそれに対応するラック上の位置が強調表示されます。位置と容量を確認しながらバイアルおよびサンプルをラックにセットします。

補足 6-12. サンプル位置の変更

サンプル位置は、上記画面に切り替わった時点で自動的に設定されます。あらかじめサンプル位置が決まっているプレートを使用する場合は、画面左下の Menu → Export Positions... を実行し、サンプル位置をタブ区切りのテキストファイルとして保存します。必要事項を変更した後ファイルを保存し、Menu → Sample Position Import...でそのファイルを読み込むと、サンプル位置が変更されます。


Immunogenicity Screening - Prepare Run Protocol
Tahoma
10
Prepare Run Protocol
Make sure the correct sensor chip is docked.
Make sure all samples & reagents are loaded in the rack and microplate according to the Rack Positions setup. (Vials should be sealed with rubber caps and microplate with adhesive foil.)
Place the buffer(s) on the left hand tray and insert the correct tubing(s), see below.
Note! Standby after run will use buffer A.
Make sure there is fresh water in the water bottle on the right hand tray.
If necessary, empty the waste bottle before start of the run.
Estimated run time: 36 h 28 min (excluding conditional statements, temperature changes and standby flow)
Estimated buffer consumption:
Running buffer
At least 700 ml
plus 65 ml/day for
standby after run
Help
Menu
< Back
Save As...
Close

基本的な注意事項、測定時間、必要なランニング緩衝液量が表示されます。Start をクリックします。

↓

設定したウィザードをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示されます。保存の場合は、Save as で Methods and Templates フォルダまたは Bia Users の各自のフォルダに保存します。保存しない場合は、Don't Save を選択します。

↓

Save in:に測定結果の保存先を設定し、File name にファイル名を入力して、Save すると測定がスタートします。

↓

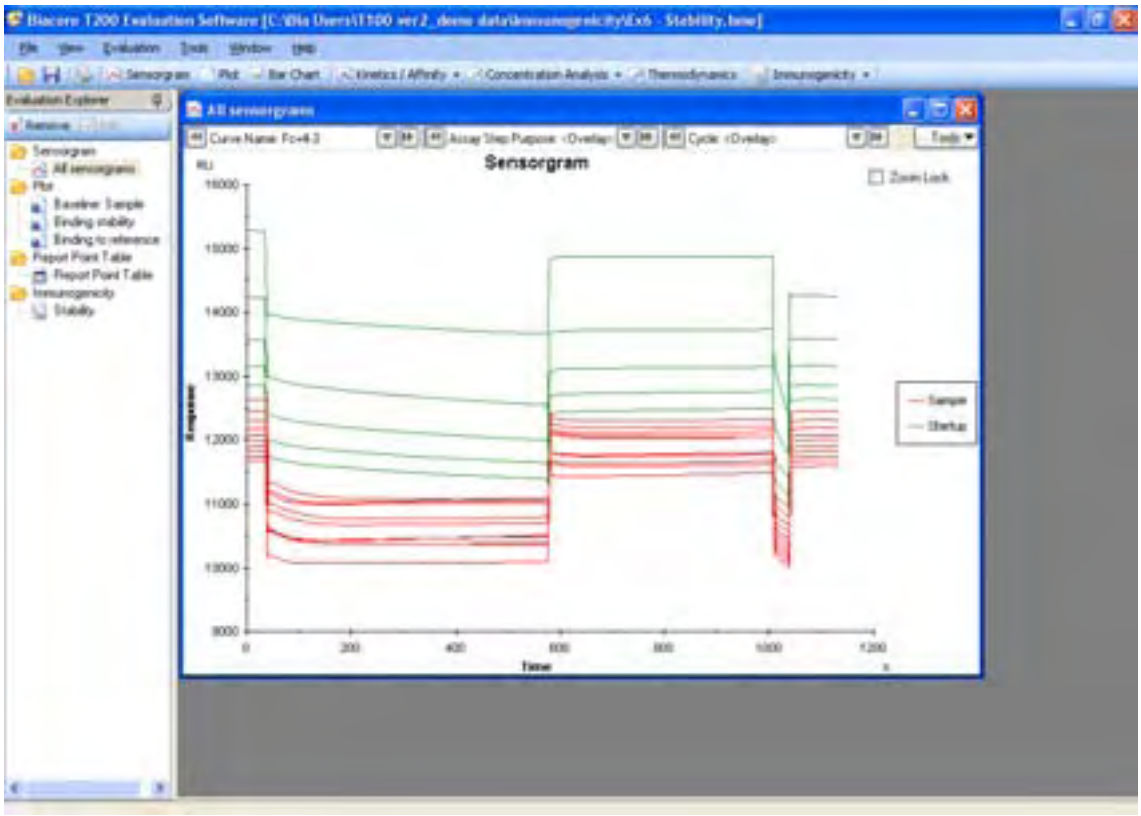
測定終了後、装置は Standby flow 状態になります。

↓

測定データは入力したファイル名で自動に保存され、Biacore T200 Evaluation Software が自動的に起動して、各サイクルの測定結果が重ね書き表示されます。

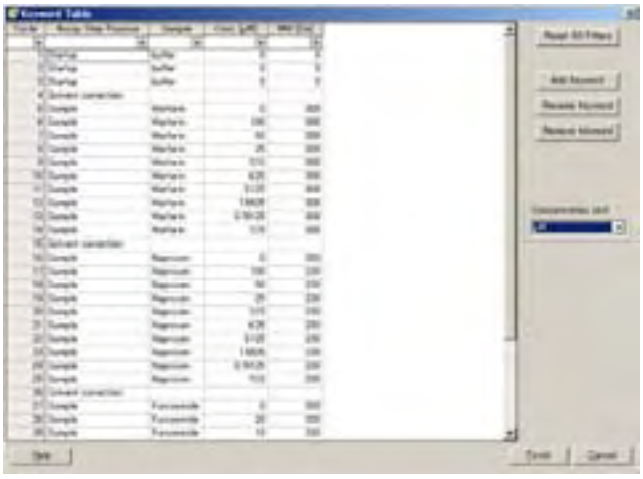
6-4-2. データ解析

ウィザードもしくはメソッドを用いた測定プログラム終了後、Evaluation ソフトウェアは自動的に立ち上がり、取得データは解析に向け移行します。

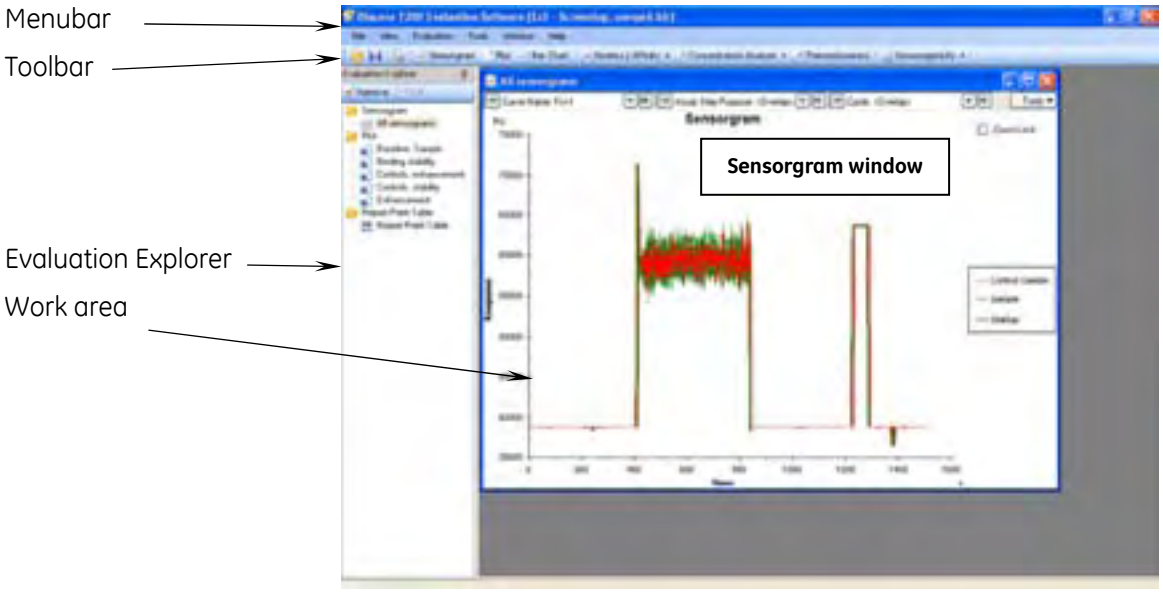


補足 6-13. サンプル情報の変更

サンプル濃度および濃度単位、サンプルの名称など入力ミスがあった場合は、解析を実行する前に、Keyword table...で変更します。Tools... → Keyword Table...をクリックします。

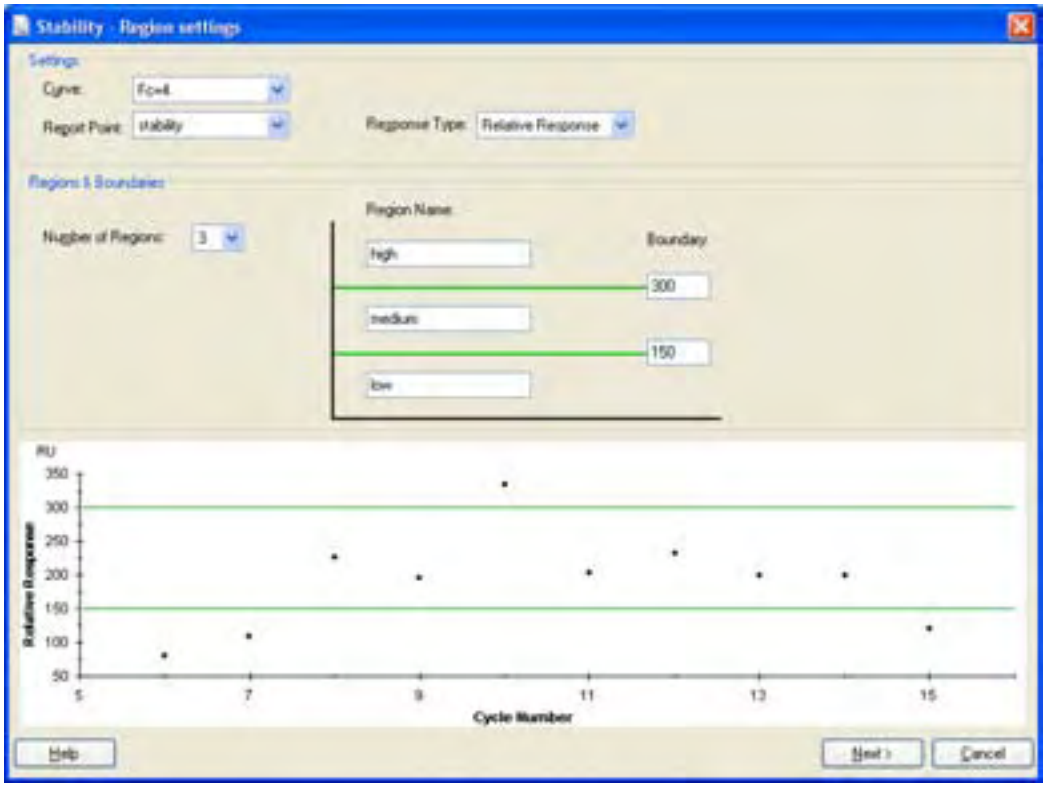


補足 6-14. 画面の説明



Menubar	すべての作業コマンドを含む各種メニュー表示
Toolbar	使用頻度の高い作業コマンドをアイコン化して表示
Evaluation Explorer	すべての測定データ、解析後のデータの表示
Sensorgram	測定により取得したセンサーグラム
Plot	測定時に取得したレポートポイント名別のプロット
Baseline	サンプル添加直前の AbsResp
Binding level	サンプル添加時の Baseline からの RelResp
Binding stability	サンプル添加直後の Baseline からの RelResp
Binding to reference	リファレンスセルに対する Binding level
Work area	Evaluation Explorer で選択したファイルを表示

Toolbar の Immunogenicity をクリックし、Stability を選択します。



ここでは、結合量ランキングのための設定をおこないます。

Settings

Curve;　評価するフローセルを選択します

Report Point;　stability を選択します

Response Type;　Relative Response を選択します

Regions & Boundaries

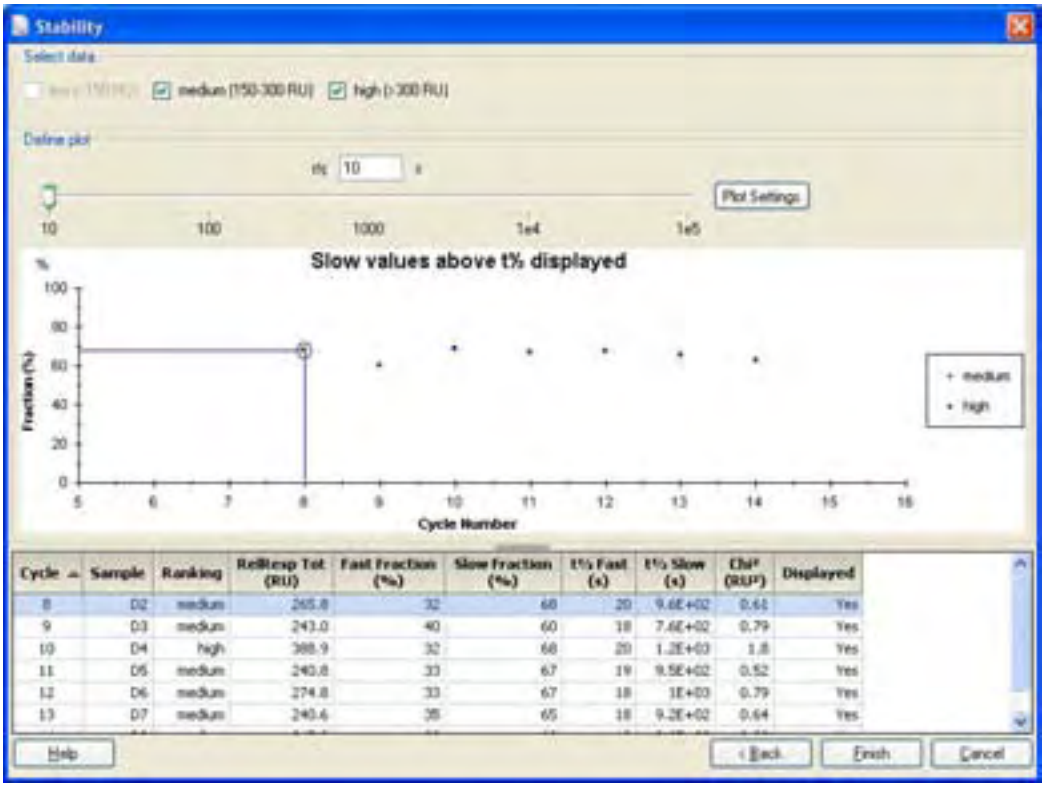
Number of Regions;　評価基準の数を設定します

Boundary;　評価基準となる数値を入力します

Region Name;　評価基準に対するカテゴリーごとの名称を入力します

Next >をクリックします。

↓



前画面で設定した評価基準値以上の結合量のサンプルについて、解析結果が画面下のテーブルに表示されます。評価基準の最小値より小さいと評価されたサンプルに関しては、自動的に解析から除外されます。画面上には、各サイクルの Slow Fraction（%）がプロットされています。解析モデルの詳細は、補足 6-15 をご参照ください。

RelResp Tot (RU);	解離直後の結合レスポンス
Fast Fraction (%);	全結合抗体に対する解離が速い抗体の割合
Slow Fraction (%);	全結合抗体に対する解離が遅い抗体の割合
$t_{1/2}$ Fast (s);	解離が速い抗体の半減期
$t_{1/2}$ Slow (s);	解離が遅い抗体の半減期

プロットデータ上部のスライダーでは、プロットに表示される Slow Fraction の $t_{1/2}$ の下限値の設定ができます。入力した時間（上記画面の場合 10 秒）より $t_{1/2}$ が長いサンプルが、プロットデータに反映されます。Plot settings で表示方法を変更することが可能です。
Finish をクリックします。

補足 6-15. 解離領域の反応モデル式および半減期の計算方法

免疫応答において産生される抗体は、カイネティクスプロパティが異なる抗体が混在していることが予測されます。しかし、既存の反応モデル式では、混在している個々の抗体を評価することができません。そのため、抗体の成熟度試験では、2 つの独立した解離成分を含んだ解離反応モデル（two-component model）を使用して、解離領域のみを解析することで評価します。

ただし、このモデルは 2 つの明確に異なる抗体が存在することを証明するものではなく、あくまでも、速い解離の抗体、遅い解離の抗体の優位性の観点から、免疫応答を分類するための評価ツールです。

解離領域におけるカーブフィッティングのモデル式は次の通りです。

$$R = R_1 \times e^{-kd1\,(t - t0)} + R_2 \times e^{-kd2\,(t - t0)}$$

R; t (s)における結合レスポンス　k_{d1} および k_{d2}; 解離速度定数

R_1 および R_2; k_{d1} および k_{d2} を求める際の解離領域開始レスポンス

また、$t_{1/2}$（半減期）の計算式は、下記になります。$t_{1/2}$ は、複合体の量（抗体結合量）が 50% 低減するのに必要な時間（秒）です。

$$t_{1/2} = \ln 2 / k_d$$

索引

A

ADAs 125, 126, 128, 144, 152, 153, 154, 165

Add Solvent Correction 36

Adjustment for controls 14

After run 69, 114

Analysis temperature 5, 27, 49, 97, 119

Anti drug Antibodies 125

Assay Steps 69, 114

B

Baseline 11, 35, 42, 55, 86, 104, 140, 151, 163, 172

Binding level 11, 12, 35, 55, 86, 104, 140, 151, 163, 172

Binding to reference 11, 17, 35, 42, 55, 86, 104, 140, 151, 163, 172

Buffer settings 69, 114

C

Calibration Curve 47

Calibration points 47

Capture 2, 24, 45, 96

Carry Over 24, 42, 96

CFCA 63

Concentration 26, 44, 47, 56, 58, 61, 69, 98, 114

Concentration Analysis 44, 56, 58, 61

Concentration unit 69, 114

Conditioning 24, 96, 118

Contact time 4, 24, 25, 46, 73, 74, 96, 97, 98, 117, 118

Control sample definition 27, 48

Control samples 27, 48

Custom Report Point 18, 61

Cut-off 129, 132, 164

Cycle Run List 6, 27, 49

Cycle Types 72, 116

D

Data Collection rate 69, 114

Deposition solution 117

Deposition solution volume 117

Detection 2, 24, 45, 69, 96, 114

Dissociation time 4, 25, 73, 74, 97
DMSO 20, 21, 22, 39, 111
Double Mix 126, 137, 160
E
Eject Rack Tray 8, 30, 52, 82, 101, 122
Enhancement 2, 45, 131, 144, 166
Exclude Curve 60
Exclude Cycle 59
Exclude point 37
Extra wash after injection with 25, 97
Extrapolate 39
F
Fitting Function 56
Flow path 2, 24, 45, 73, 74, 77, 96, 117, 118
Flow rate 4, 25, 46, 73, 74, 97, 98, 117, 118
Fraction 46
G
General 68, 113
General Settings 68
H
High viscosity solution 4, 46, 98
I
Immunogenicity 130, 137, 144, 154, 160, 165
Include Curve 60
Include Cycle 59
Incubation time 117
K
k_a 93, 94, 105, 108
k_d 93, 94, 105, 108
K_D 20, 93, 94, 105
Keyword Table 10, 34, 54, 85, 103, 139, 150, 162, 171
Kinetics/Affinity 23
km 63
M
Merged Inject 125, 130, 154, 156, 165
Mix with 46

N

Normalize 5, 27, 49, 80, 99, 119

Number of cycles 2, 25, 45, 97

Number of injections 24, 25, 97

Number of replicates 70, 71, 72, 115, 116

O

Overview 68, 112, 137, 160

P

Prime 5, 27, 49, 80, 99, 119

R

Ranking 13

Recovery solution 117

Regeneration 2, 4, 24, 45, 46, 73, 74, 96, 97, 118

Repeat calibration every 47

Repeat Control sample(s) every 5

Report 16, 40, 56, 62

Report point 56

Report Point Table 16

RI 21

S

Sample compartment temperature 5, 27, 49, 69, 97, 114, 119

Single mode 105

Single-cycle Kinetics 68

Solvent correction 25, 38, 39, 97

Stabilization period 4, 25, 98

Standby flow 9, 31, 52, 83, 102, 123, 135, 149, 159, 170

Startup 2, 24, 42, 45, 70, 73, 97

Stop Run 9, 31, 53, 84, 102, 123, 136

T

$t_{1/2}$ 174, 175

Type 73, 74

U

Use average calibration curve 56

V

van't Hoff 94

Verification 76

W

Wash solution 117

あ

アイソタイプ 125, 154, 155, 157

か

回収 111, 117, 124

拡散係数 63, 65

き

キャリーオーバーチェック 32, 42

緊急停止 9, 31, 53, 84, 102, 123, 136

く

グラフ化 19

け

結合量補正 14, 141, 152

検量線 43, 47, 56, 57, 59, 60, 63

検量線不要の濃度測定 63

こ

抗薬物抗体 125

コントロールサンプル 4, 5, 12, 13, 14, 17, 26, 27, 48, 61, 127, 129, 132, 133, 141, 146, 152, 168

さ

最大結合量 14, 141

酸性化溶液 128

サンプリング設定 7, 29, 51, 81, 100, 121

サンプル情報の入力 5, 27, 49, 98

サンプル位置の変更 7, 28, 50, 80, 99, 134, 148, 159, 169

サンプル情報の変更 10, 34, 54, 85, 103, 139, 150, 162, 171

し

初期結合速度 63

す

スクリーニング 1, 40, 41

せ

成熟度の確認 165

線形解析 94, 110

そ

増幅試薬 128

阻害法 43, 46, 125, 144
測定ポイントの削除 37, 59
ち
中和溶液 117, 125, 128
直接法 43
て
低分子化合物 20
デキストラン溶液 127
と
同定 144, 152, 154, 155, 157
ね
熱力学的パラメータ 93, 94, 110
の
濃度測定 43, 44, 63
は
バルク 21, 22
バルクレスポンス 21, 32
半減期 165, 174, 175
ひ
非線形解析 94, 110
非特異吸着 42, 126, 127, 133
ふ
ファイル名の変更 92, 107
フィッティング 15, 43, 142
複数サンプルの連続添加 3
分子量補正 14, 40, 41
ほ
ポジティブコントロール 13, 15, 42, 127, 128, 131, 142, 145
ま
摩擦率 65, 66
マストランスポート係数 63, 64
マストランスポートリミテーション 63, 64, 88
マニュアル測定 111, 117
め
免疫応答 125, 175
ゆ

有機溶媒 20
よ
溶媒補正 21, 22, 25, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 97
溶媒補正用曲線 22, 36, 37, 38
溶媒補正用曲線の延長 39
溶媒補正用曲線の削除 38
ら
ランキング 12, 14, 16, 40, 141
り
リファレンスセル 11, 17, 21, 22, 35, 39, 42, 45, 55, 86, 104, 140, 151, 163, 172
れ
レポートポイント 11, 16, 18, 32, 33, 35, 55, 56, 61, 62, 86, 104, 124, 140, 151, 163, 172
レポートポイントの追加 18, 61

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁 止 ⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁 止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁 止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁 止

電源コード・電源プラグを傷つけない

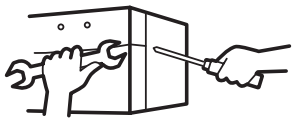
●加工しない ●束ねない ●ねじらない
●折らない ●物をのせない ●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁 止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

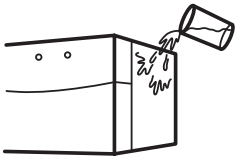
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁 止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁 止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁 止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

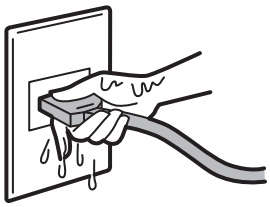
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

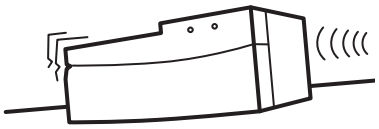
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

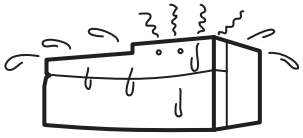
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

■機器メンテナンス・保守契約・修理のお問合せ

● 東日本技術サービス部

TEL：03-5331-9315
FAX：03-5331-9349

● 西日本技術サービス部

TEL：06-6305-4707
FAX：06-6305-3599

■テクニカルのお問合せ（バイオダイレクトライン）

● TEL：03-5331-9336

応答メッセージが聞こえましたら、下記の番号を押してください。

クロマトグラフィー関連製品 ：❶
ビアコア関連製品 ：❷
電気泳動関連製品 ：❸
その他製品 ：❹

● FAX：03-5331-9370

● e-mail：Tech-JP@ge.com

www.gelifesciences.co.jp

e-mail で最新情報をお届けしています。お申込みは上記 Web サイト左下の「メールマガジン購読」から。

©2013 GEヘルスケア・ジャパン株式会社　本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめ ご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。
お問い合わせに際してお客さまよりいただいた情報は、お客さまへの回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただく場合があります。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

Intertek
ISO 9001:2008
認証取得

取扱店